

Az *oskar* mRNS struktúrális szerepe a korai oogenezisben

Ph.D. értekezés

Készítette: Závorszky Péter

Témavezető: Dr. Erdélyi Miklós

Készült az MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézetének

Fejlődésgenetikai Csoportjában

Szeged, 2001.

Értekezésemet szeretettel és tisztelettel ajánlom Édesanyámnak,
Édesapámnak és Krisztinek.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Erdélyi Miklósnak, témavezetőmnek, azt a kiapadhatatlan emberi és szakmai támogatást, segítséget és ösztönzést, ami e munka minden szakaszán elkísért. Miklós azon kevesek egyike, aki mindvégig hitt bennem. Hálásan köszönöm ezt a bizalmat.

Köszönöm Dr. Anne Ephrussinak a lehetőséget, hogy érdemi munkát végezhettem kivételes légkörű és felszereltségű laboratóriumában. Anne mutatta meg, hogy másképp is lehet és ő volt a másik, aki mindvégig hitt bennem. Hálásan köszönöm.

Köszönöm Tóth Krisztinának hogy mellettem volt és szeretettel támogatott.

Köszönöm Dr. Antoine Giuchet-nek, hogy eredményesen tudtunk együtt dolgozni a P elem mutagenézis során.

Köszönettel tartozom Dr. Andreas Jenny-nek a molekuláris genetikai munkákban nyújtott segítségéért.

Köszönöm az MTA SzBK Fejlődésgenetikai Csoport tagjainak és az EMBL Developmental Biology Program tagjainak, hogy olyan szakmai légkörben dolgozhattam, mely egyszerre volt vidám és ösztönző.

Köszönöm Anna Cyrkalff-nak az óriáskromoszóma *in situ* hibridizációban és Anne-Mari Voe-nek a transzgenikus legyek előállításában nyújtott munkáját.

Köszönöm az MTA SZBK Fotólabor részéről Bodacz-Nagy Balázs munkáját.

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi bevezető:	1
1.1. Oogenezis:	1
1.2. A petekamra polaritásának molekuláris alapjai:	4
1.3. Az <i>oskar</i> (<i>osk</i>) szerepe a poláris plazma kialakításában:	5
2. Anyagok és Módszerek:	9
2.1. Tenyésztési körülmények:	9
2.2. Felhasznált <i>osk</i> mutánsok:	9
2.3. Felhasznált transzgenikus légytörzsek:	10
2.3.1. A különböző transzgenek molekuláris leírása:	10
2.4. Nagyléptékű P elem által indukált mutagenézis P elemes mutánsgyűjtemény előállítására:	12
2.5. A P elemek kromoszómára térképezése:	13
2.6. A P elem kiugratása az új <i>osk</i> mutánsokból:	15
2.7. Óriáskromoszóma <i>in situ</i> hibridizálás:	16
2.8. Transzformálás:	16
2.9. Kutikula preparálás embriókon:	16
2.10. F aktin festés rhodaminnal jelölt falloidinnel ováriumon:	16
2.11. BicD fehérje antitesttel történő kimutatása ováriumban:	17
2.12. Karioszóma festés propidium joddal:	18
2.13. Felhasznált molekuláris módszerek az <i>osk</i> gén analízisében:	18
2.13.1. Primerek az <i>osk</i> gén 5' régiójának analíziséhez:	18
2.13.2. Polimeráz láncreakció (PCR):	19
2.13.3. Inverz PCR:	19
2.13.3.1. A genomikus szekvencia hasítása SspI restrikciós enzimmel:	19
2.13.3.2. Ligálás:	19
2.13.3.3. A PCR-es lépés:	20
2.13.3.4. Kettős emésztés EcoRI és BglII restrikciós enzimekkel:	20
2.13.3.5. Klónozás:	20
2.13.3.6. Elektrotranszformálás:	20
2.13.3.7. MiniPrep és MidiPrep:	21
2.13.3.8. Szekvenálás:	21
2.13.4. A Northern blotnál használt eljárások:	21
2.13.4.1. Totál RNS preparálás:	21
2.13.4.2. PolyA ⁺ mRNS prepalálás totál RNS-ből (QUIAGENE Oligotex protokoll):	22
2.13.4.3. Formaldehid gél készítés és minták futtatása:	22
2.13.4.4. Elektrotranszfer:	23
2.13.4.5. Radioaktívan jelölt próba elkészítése (random primed):	23
2.13.4.6. Hibridizáció:	24
2.14. RNS <i>in vitro</i> transzkripció és DIG (digoxigenin) jelölés (módosított Boehringer eljárás):	24
2.14.1. A DNS linearizálása:	24
2.14.2. DIG jelölt antiszensz RNS transzkripció linearizált DNS mintáról:	25
2.15. DIG jelölt <i>osk</i> antiszensz RNS <i>in situ</i> hibridizálás ováriumon:	25
2.15.1. Az <i>osk</i> RNS fluoreszcens festékkel való megjelölése:	26
2.15.2. Fluoreszcens jelölt <i>osk</i> RNS <i>in situ</i> hibridizáció ováriumon:	26

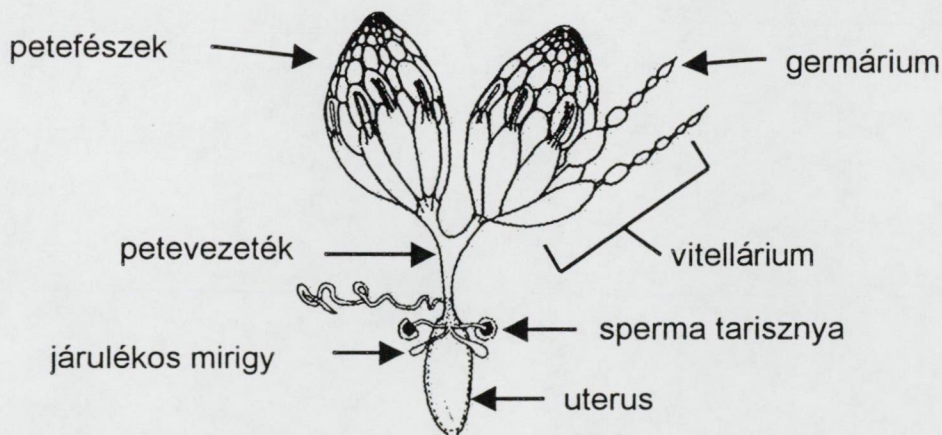
2.16. Reverz transzkripció (RT) PCR teszt Gal4 aktivált <i>UASp-osk</i> riporter gént tartalmazó mintákban:.....	27
2.16.1. Reverz transzkripció:.....	27
2.16.2. PCR-es lépés:.....	28
2.17. Mikroszkópos kiértékelés:.....	28
2.18. Internetes adatbázisok és szolgáltatások:	28
2.19. Felhasznált szoftverek:	28
3. Eredmények:.....	30
3.1 A P elemes mutánsgyűjtemény előállítása:	30
3.2 A steril mutánsgyűjtemény szűrése abdomen hiányos fenotípusra:	31
3.3 Az abdomenhiányos fenotípusú mutációk komplementációja ismert poszterior mutánsokkal:.....	31
3.4 Az új <i>osk</i> mutánsok P elemeinek kromoszómára térképezése és a mutagenézisben résztvevő kromoszómák lecserélése:.....	32
3.5 A P elemek kiugratása az új <i>osk</i> vonalakból:	32
3.6 A P elemek elhelyezkedése az új <i>osk</i> mutánsok óriáskromoszómáin:	33
3.7 Az új <i>osk</i> mutációk részletes komplementációs analízise:	33
3.8 Menekítési kísérlet genomikus <i>osk</i> szekvenciával:	35
3.9 Az új <i>osk</i> mutánsok fenotípusának leírása:	36
3.9.1 A follikuláris sejtek rendellenes felhalmozódása:.....	37
3.9.2 A karioszóma szétesése:	39
3.9.3 Az új <i>osk</i> mutánsokban az <i>osk</i> mRNS mennyisége nagy mértékben csökken, illetve hiányzik:	40
3.9.4 Az új <i>osk</i> mutánsok vizsgálata Northern blottal:	41
3.10 Az új <i>osk</i> mutánsokban a petesejt kialakul:.....	43
3.11 Az új <i>osk</i> mutánsok molekuláris jellemzése:.....	43
3.11.1 Az <i>osk</i> RNS hipomorf mutánsok molekuláris jellemzése:.....	43
3.11.2 Az <i>osk</i> RNS hiányos <i>osk</i> ⁴⁸⁷ mutáns molekuláris jellemzése:	46
3.12 A petét nem rakó fenotípus menekítése <i>osk</i> tarszgenekkel és <i>osk</i> fehérje hiányos mutánsokkal:.....	46
3.12.1 A petét nem rakó fenotípust az <i>osk</i> mRNS menekíti:.....	47
3.12.2 Az <i>osk</i> transzkript menekítő képessége nem modulos:.....	53
4. Eredmények összefoglalása:.....	54
5. Eredmények megbeszélése:	55
Summary / Angol nyelvű összefoglaló:	64
Közlemények jegyzéke és idézetek:	68
Rövidítések jegyzéke:.....	72
Irodalmi hivatkozások listája:.....	74

1. Irodalmi bevezető:

A muslica élete a petesejt megtermékenyülésével kezdődik. A megtermékenyítést követően az egyedfejlődés kezdeti lépéseit az anyai hatású gének géntermékei vezérlik. A petesejt a megtermékenyítés pillanatában egy speciálisan felkészített állapotban van. Az oogenezis során kerülnek a petesejtbe azok a géntermékek, determinánsok, melyek még a megtermékenyítés előtt meghatározzák a majdan kialakuló embrió fő testtengelyeit és ősvarsejtjeit.

1.1. Oogenezis:

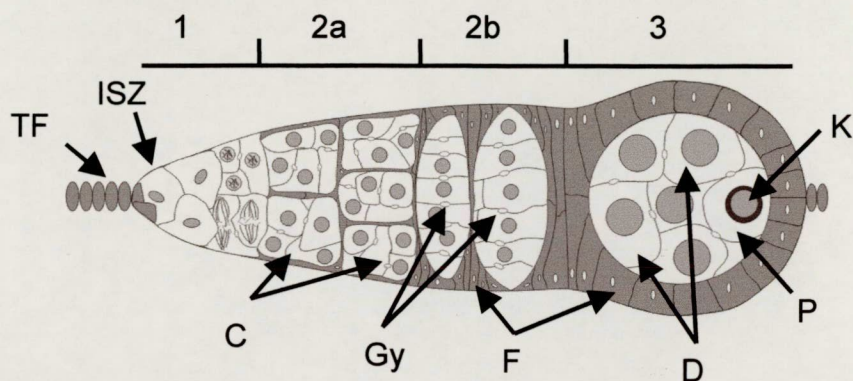
A petefészkekben a peteérés során jönnek létre a peték. Egy petefészket átlagosan 16 petecső alkot (1. ábra). A petecső terminális részén helyezkedik el a germárium, ahol kialakulnak a petekezdemények, más néven petekamrák.



1. ábra A nőstény muslica szaporító szerve. (Miller, 1950)

A germáriumból a petekezdemények a vitelláriumba jutnak, ahol differenciálódásuk során kialakul az érett pete. A petekamrák kialakulását és differenciációját morfológiai leírásokból és újabban ellenanyag festésen alapuló kísérletekből ismerjük (King,

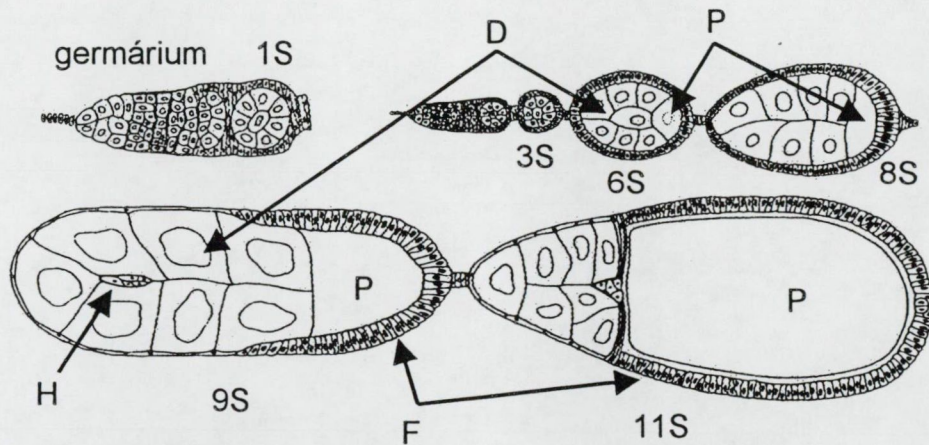
1970; Mahowald and Kambyssellis, 1980; Spradling, 1997). A germárium csúcsát a szomatikus sejt eredetű terminális filament sejtek rögzítik és határolják (2. ábra).



2. ábra A germárium sematikus rajza. Szürke szín jelöli a szomatikus eredetű sejteket, fehér szín az ivarsejt eredetű sejteket. TF=terminális filament sejtek, ISZ=ivarsejt eredetű szemsejt, C= ciszta, Gy= gyűrűcsatorna, F= follikuláris sejtek, D= dajkasejtek, P= petesejt, K= karioszóma. Az 1, 2a, 2b, 3 a germárium régióit jelölik.

A germárium legelején található a 2-3 db ivarsejt eredetű szemsejt. A szemsejt osztódásával létrejött utódsejtek egyike megtartja a szemsejt osztódó képességét, a másik sejt cisztoblasztá differenciálódik. A cisztoblasztok 4 gyors nem teljes mitotikus osztódáson mennek keresztül és létrehozzák a 16 sejtéből álló cisztát, melynek sejtjei gyűrűcsatornákon (King, 1970; Warn et al., 1985) keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A 16 sejtéből 15 dajkasejtté alakul, és 1 sejt petesejtté differenciálódik. A germárium 2a és 2b szakasza között eldől, hogy a két, 4 gyűrűcsatornával rendelkező sejt közül melyik lesz a petesejt. A döntés pontos részletei még nem tisztázottak. Azt azonban tudjuk, hogy a Ciklin A-ban és Dinein-ben gazdag fuzóma (Lin et al., 1994; McGrail and Hays, 1997) nevű képződménynek kulcs szerepe van a cisztát kialakító osztódások irányának meghatározásában, mégpedig oly módon, hogy a fuzóma mindig kapcsolatban marad az osztódási orsó egyik pólusával. Az osztódás után a fuzómát nem tartalmazó utódsejt fuzómát képez és a gyűrűcsatornán keresztül a már meglévő fuzó-

ma struktúrához kapcsolódik. Így az eredeti fuzóma anyag csak az egyik 4 gyűrűcsatornás sejten van meg. Feltételezés szerint, ez az örökletes különbség lenne a meghatározó a petesejt kiválasztásában (de Cuevas and Spradling, 1998). A germárium 2b szakaszán a cisztákat szomatikus eredetű follikuláris sejtek veszik körül, létrehozva a petekamrát (2. ábra). A 3-as szakaszban kerül a petesejt a petekamrán belül a poszteior pólusra, ami meghatározza az összes későbbi polarizálódási eseményt (Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1994). A germáriumot az 1. stádiumos petekamra hagyja el. Morfológiai adatok alapján 14 fejlődési stádiumra osztották a petekamrák fejlődését (3. ábra), melynek részletes leírását King, 1970 és Mahowald and Kambyzellis, 1980 munkái közlik.



3. ábra Különböző stádiumú petekamrák sematikus rajza. 1S= 1. stádiumos petekamra, 3S= 3. stádiumos petekamra, 6S= 6. stádiumos petekamra, 8S= 8. stádiumos petekamra, 9S= 9. stádiumos petekamra, 11S= 11. stádiumos petekamra, D= dajkasejt, P= petesejt, H= határsejt, F= follikuláris sejt.

A petekamrák mérete az érés során jelentősen növekszik, ami a politenizálódott dajkasejtekben folyó intenzív génexpresszió következménye. A dajkasejtekből a gyűrűcsatornákon át a petesejtbe áramló citoplazma miatt, a 7. petekamra stádiumtól kezdve a petesejt térfogata jelentősen növekedni kezd. A 8. stádiumban megjelenik a petesejt-

ben a szikanyag. A 9. stádiumtól a petesejt növekedését követve a follikuláris sejtek a petesejt felé vándorolnak és egyre jobban oszlopos alakot vesznek fel. A dajkasejteket borító follikuláris sejtek ellaposodnak. A 6-10 sejtből álló határsejtek megkezdik vándorlásukat a dajkasejtek között a petesejt anterior része felé. Elkezdődik a vitellin membrán komponenseinek szintézise, melyek vezikulumokba csomagolódnak. A késő 10. stádiumban megindul a centripetális follikuláris sejtek vándorlása, ami végül elválasztja a petesejtet a dajkasejtektől. Ugyancsak elindul a citoplazma tartalmának átréselése a dajkasejtekből a petesejtbe (dumping). Kialakul a vitellinmembrán. A 12. stádiumra befejeződik a dajkasejtek citoplazmájának átpumpálása. A 13. és 14. stádiumokban kialakul a mikropilus, a korionburok és a háti korionfüggelék.

1.2. A petekamra polaritásának molekuláris alapjai:

Az első polaritást befolyásoló lépés az, amikor a petesejt a petekamra poszterior részére vándorol a germárium 2b szakaszában. E morfogenetikus elmozdulásban a DE-kadherinnek van szerepe (Godt and Tepass, 1998; Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998). A germáriumot elhagyva a petesejt sejtmagjában transzkripció nem történik. Egyetlen átiródó génről tudunk, és ez a *gurken* (*grk*) gén esete. Nem sokkal a germárium elhagyását követően, a 4. és 6. stádium között, a petesejt egy EGF motívummal rendelkező, szekretált *gurken* fehérje jelet küld a follikuláris sejtek felé. A petekamra mindkét pólusán kb. 200 sejt érzékeny a jel fogadására (Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1998). A follikuláris sejtek petesejttel érintkező felszínén vannak a GRK receptorok (EGFR= epidermal growth factor receptor). A jelet felfogó follikuláris sejtek poszterior follikuláris sejtekké differenciálódnak. Végsősoron tehát a petesejt poszterior helyzete indukálja a poszterior follikuláris sejtsorsot.

A korai oogenezis során az ivarsejtvonal eredetű sejtek közül egyedül a petesejtben van aktív mikrotubulus szervező központ (MTOC= microtubule organizing center), ami a gyűrűcsatornákon keresztül a dajkasejtekbe irányuló, polarizált mikrotubulus hálózatot hoz létre. E hálózaton a dajkasejtekből a petesejtbe mínusz-vég motor molekulák közlekednek, melyek transzport folyamatokban vesznek részt. A 6., 7. stádiumban a korábban a petesejt GRK jelére differenciálódó poszterior follikuláris sejtek egy eddig még ismeretlen jelet küldenek vissza a petesejtbe, aminek hatására felbomlik a mikrotubulus hálózat és ellentétesen polarizációval szerveződik újjá. Mínusz végű mikrotubulusok jelennek meg a petesejt anterior végén, pozitív végükkel a petesejt poszterior vége felé mutatva. E polaritásváltást követően a petesejt sejtmagja és vele együtt a mag körül lokalizált GRK a poszterior pólusról az anterior dorzális sarokba vándorol (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Roth et al., 1995). A GRK az anterior dorzális sarokban a környező follikuláris sejtek dorzális follikuláris sejtekké differenciálódását indukálja (Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993; Ray and Schupbach, 1996). A dorzális follikuláris sejtekben az EGFR aktiválása a VEIN, RHOMBOID és SPITZ termelését váltja ki, melyek maguk is EGFR ligandok (Sapir et al., 1998; Wasserman and Freeman, 1998). A magas EGRF szint három inhibitor, az ARGOS, KKKON és SPROUTY termelését is indukálja (Ghiglione et al., 1999; Peri et al., 1999; Wasserman and Freeman, 1998). Az EGFR indukálás és gátlás olyan helyi komplex mintázatot hoz létre, amely pl. a háti függelék pontos helyét jelöli ki (Wasserman and Freeman, 1998).

1.3. Az oskar (osk) szerepe a poláris plazma kialakításában:

Az *osk* RNS már a korai oogenezis során átíródik és a petesejtben koncentrálnak. A 7. petekamra stádiumig az *osk* RNS eloszlása a petesejtben homogén. A 7. és

8. stádiumban megkezdődik az *osk* RNS poszterior lokalizációja, ugyanakkor átmene-
tileg a petesejt anterior részén is kimutatható (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al.,
1991). A 8. stádiumban a poszterior póluson lokalizált *osk* mRNS-ről megkezdődik az
oskar fehérje átírása (Markussen et al., 1995; Rongo et al., 1995), mely az RNS-hez
hasonlóan a poszterior végen lokalizált. Kiderült, hogy az *osk* lokalizált aktivitása nél-
külözhetetlen az abdomen és az ivarsejtek kialakulásához (Lehmann and Nüsslein-
Volhard, 1986). Az *osk* RNS lokalizálódásának elmaradása abdomenhiányos és ivar-
sejthiányos embriókat eredményez. Ha az *osk* RNS-t a petesejt anterior részén mester-
ségesen lokalizáljuk, ektopikus abdomen struktúrákat és ivarsejteket hoz létre az ante-
rior póluson (Ephrussi and Lehmann, 1992). Azaz az *osk* szükséges és elégséges az
ivarsejt és abdomen determinánsok létrehozásához. Ezek az eredmények hasonló-
ak a citoplazma átültetési kísérletekben kapott eredményekhez, amikor az érett pete
poszterior pólusáról citoplazmát ültettek át egy korai embrió anterior pólusára, és ez
ektopikus abdomen képleteket és ivarsejteket indukált az anterior póluson (Frohnhofer
et al., 1986; Illmensee and Mahowald, 1974; Lehmann and Nüsslein-Volhard, 1986;
Lehmann and Nüsslein-Volhard, 1991). A petékből átültetett citoplazma ektopikus
indukciós képességéért az ún. poláris plazma felelős. Az *osk* gén tehát esszenciális
szerepet játszik a poláris plazma létrehozásában. A poláris plazma a muslicában
tiszt, szikanyag mentes citoplazma (Mahowald, 1992), mely nagy mennyiségben
tartalmaz ún. poláris granulumokat. E granulumok RNS-t tartalmaznak (Mahowald,
1971), valószínűleg ribonukleoprotein (RNP) formában. A poláris plazma már a 12.
petekamra stádiumtól kezd megformálódni a petesejt poszterior végén. Úgy tűnik,
hogy a poláris plazma komponenseit az oogenezis során kell a petesejt poszterior vé-
gébe juttatni, majd összeszerelni. Számos gént azonosítottak, melyek a poláris plazma
létrejöttét befolyásolják. Ezek a *spire* (*spir*), *cappuchino* (*capu*), *orb* (*orb*), *mago*

nashi (mago), *staufen (stau)*, *osk*, *vasa (vas)*, *valois (vls)*, *tudor (tud)*, *Polar granule component (pgc)*, *mitochondrial large ribosomal RNS (mtlrRNS)*, *mitochondrial small ribosomal RNS (mtsrRNS)* (Boswell et al., 1991; Boswell and Mahowald, 1985; Ephrussi et al., 1991; Iida and Kobayashi, 1998; Kashikawa et al., 1999; Kim-Ha et al., 1991; Lasko and Ashburner, 1990; Lehmann and Nusslein-Volhard, 1986; Manseau and Schupbach, 1989; Nakamura et al., 1996; St Johnston et al., 1991). A *nanos (nos)*, *pumilio (pum)*, *cyclin B (cycB)* és a *germ cell-less (gcl)* gének ugyan maguk aktívan nem építik a poláris plazmát, RNS-eik mégis fontos komponensei az érett pete poláris plazmájának. A NOS, mint abdomen determináns, és a PUM kizárólag az abdomen kialakításában vesznek részt (Macdonald, 1992; Wang and Lehmann, 1991). A *cycB* és *gcl* RNS-ek az embrió formálódó ősvarsejtjeiben figyelhetők meg (Lehner and O'Farrell, 1990; Whitfield et al., 1989). Az *osk* esszenciális szerepét mutatja, hogy a felsorolt gének közül számos részt vesz az *osk* RNS lokalizációjában és transzlációjának szabályozásában (CAPU, SPIR, MAGO, ORB, STAU).

Az *osk* poláris plazma szervező funkciójának két sarkalatos pontja az *osk* mRNS lokalizációja a petesejt poszterior pólusán és a lokalizált RNS transzlációja. A nem lokalizált *osk* mRNS transzlációja gátolt (Kim-Ha et al., 1995), amit a Bruno fehérjének az *osk* 3'NTR régióján elhelyezkedő Brunora reagáló elemhez (BRE) való kötődése okoz. A gátlásban részt vesz még az Apontic (Lie and Macdonald, 1999) és a p50 fehérje (Gunkel et al., 1998). A STAU-nak kulcsszerepe van az *osk* mRNS-nek a poszterior pólusra történő szállításában. Erős *stau* mutánsban nem lokalizálódik az *osk* mRNS. A STAU együtt detektálható az *osk* mRNS-sel az RNS lokalizáció során (Ephrussi et al., 1991). Nemrég azonosították a STAU-nak az *osk* 3'NTR-ét kötő doménjét (Micklem et al., 2000), mellyel a lokalizáció során az *osk* RNS-hez kapcsolódik. A poszterior póluson lokalizált és kihorgonyozott *osk* mRNS felszabadul a transz-

lációs gátlás alól (Gunkel et al., 1998; Markussen et al., 1995; Rongo et al., 1995). Az *osk* translációjának aktiválásában a *stau*, *vas*, *aubergine (aub)* és *osk* géneknek van szerepük. Megtalálták a STAU-nak az *osk* transláció szabályozásában résztvevő fehérje doménjét (Micklem et al., 2000). Az OSK-ra szükség van a poszterior póluson, hogy saját mRNS-ének kihorgonyzott állapotát fenntartsa, és így pozitív visszacsatolással hat saját translációjára (Markussen et al., 1995; Rongo et al., 1995). OSK hiányában az *osk* mRNS delokalizálódik és nem képződik poláris plazma (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991).

2. Anyagok és Módszerek:

2.1. Tenyésztési körülmények:

A *Drosophila* törzsek fenntartásához standard muslica táptalajt használtunk, melynek főbb komponensei: kukoricadara, sütőélesztő, agar és cukor. A tenyésztés a legtöbb esetben 25°C-on történt. Az ettől eltérő hőmérsékletet az adott kísérlet leírásánál tüntettük fel.

2.2. Felhasznált *osk* mutánsok:

Az *osk*⁵⁴, *osk*⁸⁴, *osk*³⁶⁶ allélek és az *osk* gént teljesen eltávolító delécio *Df p^{XT103}* leírását Lehmann munkája tartalmazza (Lehmann and Nüsslein-Volhard, 1986). Az *osk*⁵⁴, *osk*⁸⁴, *osk*³⁶⁶ allélek molekuláris adatai Kim-Ha munkájából származnak (Kim-Ha et al., 1991).

*osk*⁵⁴ : A homozigóta nőstények sterilek, nincsenek életképes utódaik. A mutáció az *osk* gén első exonjának végén van, a 179-es aminosav első nukleotidja után két nukleotid kivágódott, eltávolítva ezzel az exon-intron határt. A kivágódás után következő szekvencia egy stop kodont kódol (UAG= stop 'amber'). Fehérje null mutáns.

*osk*⁸⁴ : A homozigóta nőstények sterilek, nincsenek életképes utódaik. A mutáció az *osk* gén második exonjának közepén van, a 254-es aminosav első nukleotidja C-ről T-re változott és így arginin helyett stop kodont kódol (CGA= Arg, UGA= stop). Fehérje null mutáns.

*osk*³⁴⁶ : A homozigóta nőstények sterilek, nincsenek életképes utódaik. A mutáció az *osk* gén harmadik exonjának elején van, a 324-es aminosav első nukleotidja C-ről T-re változott és így az glutamin helyett stop kodont kódol (CAA= Gln, UAA= stop 'ochre'). Fehérje null mutáns.

2.3. Felhasznált transzgenikus légytörzsek:

Alaptörzsekből és transzformált vonalak keresztezéséből állítottuk elő a következő transzgenikus segédtörzseket.

$w; P(w^+ \text{ osk}^+)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$, $w; P(oskM1L)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$,
 $w; P(oskM139L)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$, $w; P(M1M2lacZwt4.1)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$,
 $w; P(M1M2lacZMed1)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$, $w; P(GFP-cTmG1)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$,
 $w; P(mM1SLmM2)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$, $w; P(NH1A)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$,
 $w; P(NGT40)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$, $w; Sco/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$,
 $w; P(nosGal4VP16)/TM3$, $w; P(mM1mM2stop)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$, $w; P(UOK-5)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$,
 $w; P(MO4A)/SM6b; Df p^{XT103}/TM3$.

2.3.1. A különböző transzgének molekuláris leírása:

$P(w^+ \text{ osk}^+)$: genomikus szekvencia, mely tartalmazza az *osk* gén promóter régióját és az *osk* gén transzkripció egységét (Ephrussi et al., 1992).

$P(oskM1L)$: *osk* promóter + *osk* gén kódoló szakasza (genomikus), M1 transzlációs iniciációs kodon (AUG) leucin kodonná (CUG) változtatva + *osk* 3' nem transzlálódó régió (NTR) (Markussen et al., 1995).

$P(oskM139L)$: *osk* promóter + *osk* gén kódoló szakasza (genomikus), M2 transzlációs iniciációs kodon (AUG) Leu kodonná változtatva (CUG) + *osk* 3' NTR (Markussen et al., 1995).

$P(M1M2lacZwt4.1)$: *osk* promóter + az *osk* gén M1 transzlációs iniciációs hely és M2 transzlációs iniciációs hely közötti szakasza + lacZ gén kódoló szakasza + *osk* 3' NTR (Gunkel et al., 1998).

P(M1M2lacZMed1): *osk* promóter + *osk* gén M1 és M2 közötti szakasza + lacZ gén kódoló szakasza + *Medfly osk* 3' NTR (Gunkel, nem publikált adat).

P(GFP-cTmG1): *osk* promóter + 30 bp az *osk* gén transzkripció egységéből (M1 mutációval elrontva) + *celluláris tropomiozin II (cTm)* 5' NTR + zöld fluoreszcens fehérje (GFP) kódoló szakaszának 4 aminosava + *cTm* teljes kódoló szakasza + *cTm* 3' NTR.

P(mM1mM2stop): *osk* promóter + *osk* gén kódoló szakasza (genomikus), M1 és M2 elrontva, a 179-es aminosav stopkodonná mutáltatva (mint *osk*⁵⁴) + *osk* 3' NTR.

P(mM1SLmM2): *osk* promóter + *osk* gén kódoló szakasza (genomikus), M1 és M2 elrontva, hajtű hurok (hairpin loop) szakasz van beillesztve M1 és M2 közé, a második exonban leolvasási keret eltolódását okozó (frameshift) mutáció + *osk* 3' NTR.

P(NGT40): *nanos (nos)* promóter + élesztő Gal4 gén + *Tubulin84B (Tub84B)* 3' NTR, a *nos* promóter biztosítja a korai ivarsejtekben a magas expressziót, a *Tub84B* 3' NTR biztosítja a mRNS petesejtbe szállítását és transzlációt (Tracey et al., 2000), a Gal4 aktivált UASp-LacZ riporter gén expressziós mintázata az ováriumban: a 14 stádiumból a 2. stádiumos petekamrától az 5. stádiumos petekamráig látható festődés.

P(nosGal4VP16): *nos* promóter + élesztő Gal4 gén + *nos* 3' NTR, a *nos* promóter biztosítja a korai ivarsejtekben a magas expressziót, a *nos* 3' NTR biztosítja a mRNS petesejtbe szállítását és a hatékony transzlációt (Van Doren et al., 1998), Gal4 fehérjével indukált UASp-LacZ riporter gén expressziós mintázata az ováriumban: a 14 stádiumból az 1. stádiumos petekamrától a 11. stádiumos petekamráig terjed, a *P(NGT40)*-nél jóval erősebb jelet ad minden stádiumban.

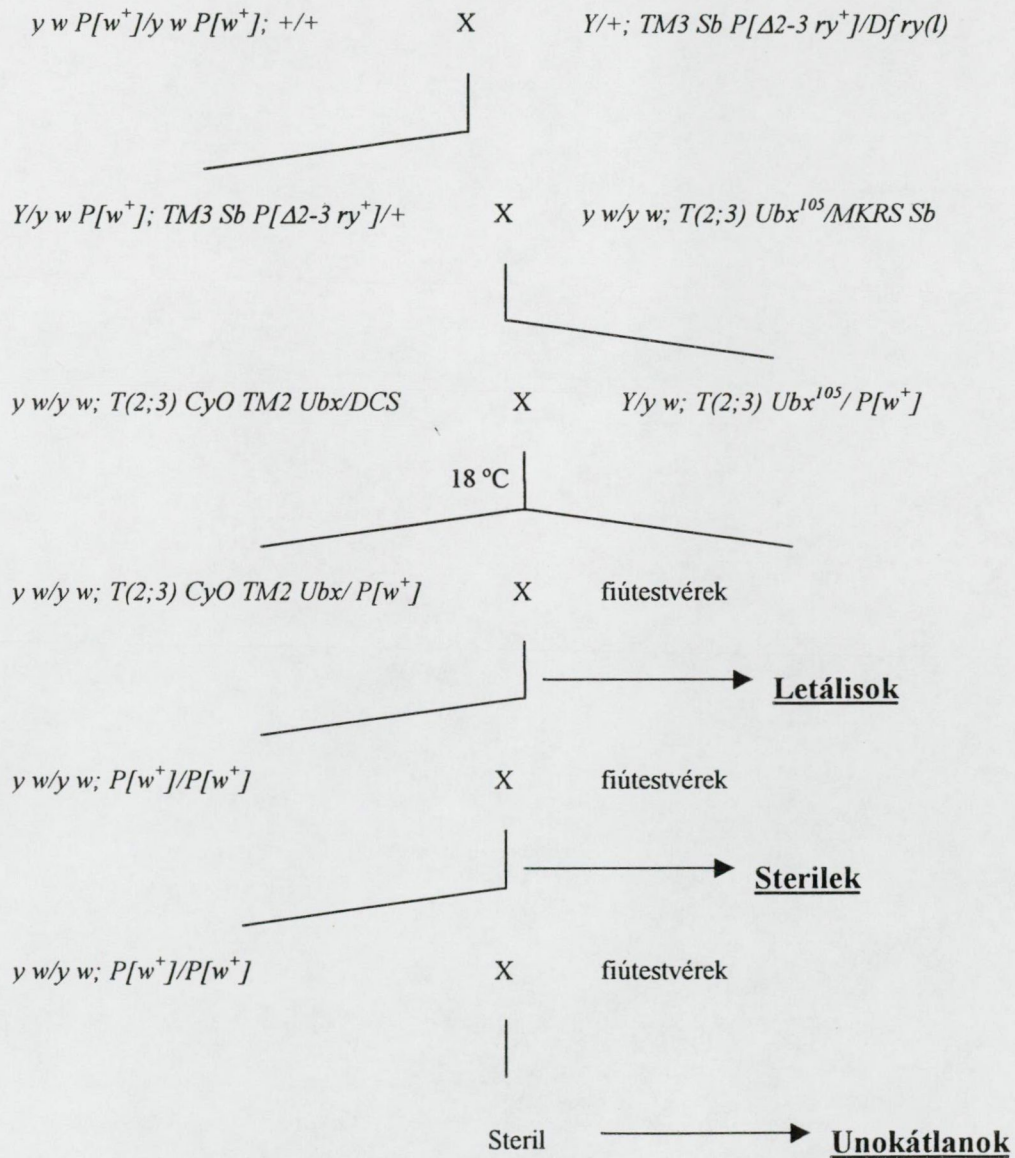
P(UOK-5): élesztő UAS elem (Gal4-gyel aktiválható) 19 bázissal az *osk* gén első exonja előtt + *osk* gén kódoló szakasza (genomikus) + *K10* gén 3' NTR.

P(MO4A): *osk* promóter + *osk* gén kódoló szakasza (cDNS) + *osk* 3' NTR, a polyA jel utáni XbaI hasítóhelynél végződik a szekvencia.

2.4. Nagyléptékű P elem által indukált mutagenézis P elemes mutánsgyűjtemény

előállítására:

A kísérletben felhasznált törzsek: $+/Y; Df\ ry(l)/TM3\ Sb\ P[\Delta 2-3\ ry^+]$, $y\ w/y\ w;$ $P[w^+]/P[w^+]$, $y\ w/y\ w;$ $T(2;3).Ubx^{105}/MKRS\ Sb$, $y\ w/y\ w;$ $T(2;3)\ CyO\ TM2\ Ubx/DCS$. A keresztezést a 4. ábra mutatja be. A dolgozatban az *Y* a hímek nemi



4. ábra. A P elem mutagenézis keresztezési sémája.

kromoszómáját, a *y* pedig a *yellow* marker gént jelöli.

Fehér szemszínű (*w*) háttéren dolgoztunk, hogy nyomon tudjuk követni a *P* elemet, ami a piros szemszínért felelős gént (*w*⁺) hordozza. A *P* elem ugrató (Jump starter) hímeket (*y w P[w*⁺*]/Y; +/TM3 Sb P[Δ2-3 ry*⁺*]*) egy második és harmadik kromoszómát érintő reciprok transzlokációs törzzsel (*y w/y w; T(2;3) Ubx*¹⁰⁵*/MKRS Sb*) kereszteztük össze, melynek harmadik kromoszómás tagja az *Ubx*¹⁰⁵ látható markert hordozza. Az *Sb* domináns marker homozigóta formában letális. A piros szemszínre *P[w*⁺*]* és az *Ubx*¹⁰⁵ markerre szelektálva hímeket gyűjtöttünk és párkeresztezésekben egy második és harmadik kromoszómát érintő balanszeres reciprok transzlokációs törzs szüzeivel kereszteztük be (*y w/y w; T(2;3) CyO TM2 Ubx/DCS*). Ez a törzs hordoz egy domináns hidegérzékeny letális mutációt (*DCS*: dominant cold sensitive lethal=domináns hideg érzékeny letális), azaz 18°C-on a *DCS*-t hordozó állatok elpusztulnak. Az *Ubx* domináns marker homozigóta formában letális. Így a keresztezésekben egy egyszerű 18°C-os inkubálással, légyválogatás nélkül állítottuk elő a *P* elem inszerciót vagy a második, vagy a harmadik kromoszómán hordozó törzseket (*y w; T(2;3) CyO TM2 Ubx/P[w*⁺*]*).

2.5. A *P* elemek kromoszómára térképezése:

Felhasznált törzsek: *y w/y w; SM6b/Sco; MKRS/TM6b, w/w; +/+; TM3/TM6b, y w/y w; SM6b/Sco; +/+*.

A keresztezést az 5. ábra mutatja. Fehér szemszínű *w* (*white*) háttéren követtük a *P* elem piros szemszínét okozó *P[w*⁺*]* marker génjét. A *P* elemet hordozó törzsből hímeket (*y w/Y; T(2;3) CyO TM2 Ubx/P[w*⁺*]*) vettünk ki és összekereszteztük *y w/y w; SM6b/Sco; MKRS/TM6b* szűz nőstényekkel. Az utódok közül kiválogattuk a *y w/Y; SM6b/(+); TM6b/(P[w*⁺*])* hímeket [a (+) és (*P[w*⁺*]*) jelölés itt azt jelenti, hogy ebben

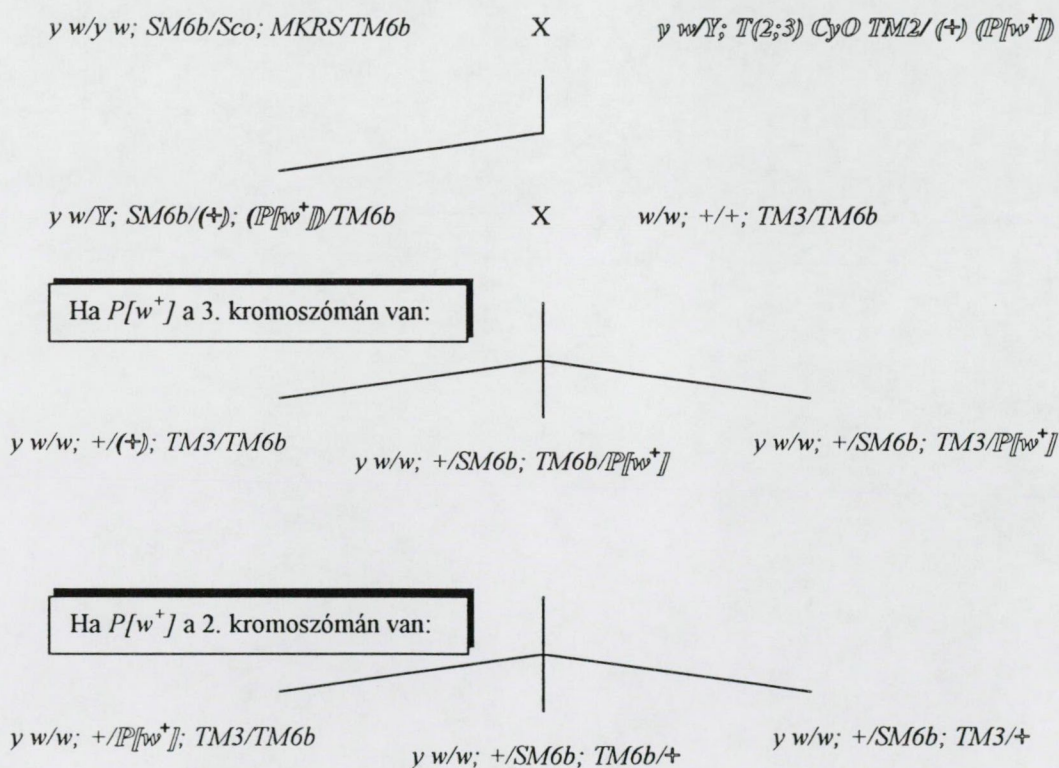
a lépésben még nem tudtuk pontosan melyik kromoszómán van a P elem] és w/w ; $+/+$; $TM3/TM6b$ szűz nőstényekkel kereszteztük őket. A 3. kromoszómás inszerciók esetében a $y w/w$; $SM6b/+$; $TM3/P[w^+]$ egyedeket felhasználva egy újabb keresztezéssel megalapítottuk az $SM6b$ mentes w ; $+/+$; $P[w^+]/TM3$ törzsket.

Ha a P elem a harmadik kromoszómán van: 3 féle genotípusú utódot kapunk (a $TM6b$ homozigóta formában letális).

w ; $SM6b/+$; $TM6b/P[w^+]$, w ; $SM6b/+$; $TM3/P[w^+]$, w ; $+/+$; $TM6b/TM3$

Ha a P elem a második kromoszómán van: 3 féle genotípusú utódot kapunk (a $TM6b$ homozigóta formában letális).

w ; $P[w^+]/+$; $TM6b/TM3$, w ; $SM6b/+$; $TM3/+$, w ; $SM6b/+$; $TM6b/+$

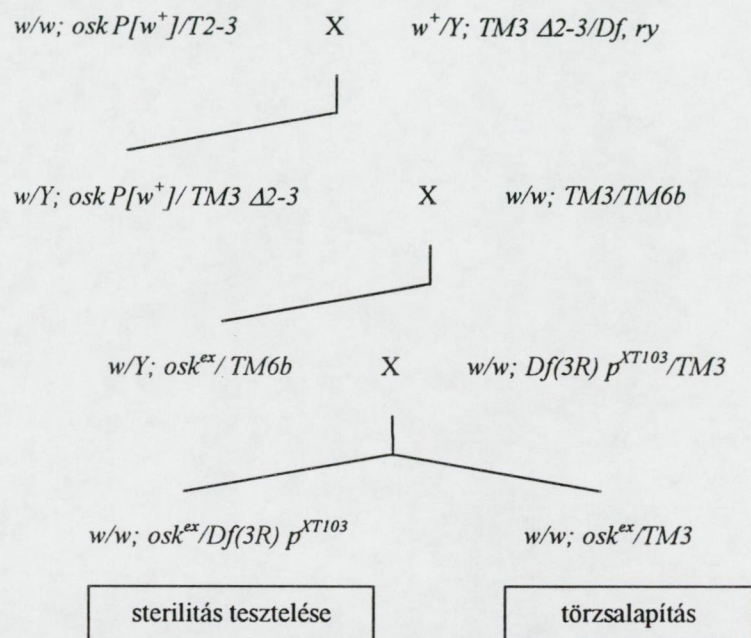


5. ábra. A kromoszómára térképezés keresztezési sémája. A körvonalas betűkkel jelzett kromoszómák a mutagenézisből származnak.

2.6. A P elem kiugratása az új *osk* mutánsokból:

Felhasznált törzsek: Y/w^+ ; $TM3\ Sb\ P[\Delta2-3\ ry^+]/Df\ ry(l)$, $y\ w/y\ w$; $osk\ P[w^+]/T(2;3)\ CyO\ TM2\ Ubx$, w/w ; $TM6b/TM3$, w/w ; $Df\ p^{XT103}/TM3$.

A keresztezést az 6. ábra mutatja. A P elemet tartalmazó új *osk* mutánsokat



6. ábra. A P elem kiugratásának keresztezési sémája. A T2-3 a T(2;3) CyO TM2 Ubx kromoszóma rövidítése.

(w/w ; $osk\ P[w^+]/T2-3$) összekereszteltük egy transzpozáz forrással (Y/w^+ ; $TM3\ Sb\ P[\Delta2-3\ ry^+]/Df\ ry(l)$). Az „ugrató” Y/w ; $TM3\ Sb\ P[\Delta2-3\ ry^+]/osk\ P[w^+]$ hímeket harmadik kromoszómás kettős balanszert hordozó törzzsel (w/w ; $TM6b/TM3$) kereszteltük össze. A fehér szemszínű w/w ; $osk^{ex}/TM6b$ vonalakat *osk* delécióval (w/w ; $Df\ p^{XT103}/TM3$) kereszteltük össze. A keresztezésből származó $Df\ p^{XT103}/osk^{ex}$ utódok sterilitását teszteltük és az utódok egy másik részéből törzset alapítottunk (w/w ; $TM3/osk^{ex}$).

2.7. Óriáskromoszóma in situ hibridizálás:

A P elemek helyének óriáskromoszómán történt meghatározását az EMBL Fejlődésgenetikai Intézetében működő *in situ* hibridizációs szolgálat végezte. A kísérlet során a *y w; T(2;3) CyO TM2 Ubx/P[w⁺]* törzseket használtuk. Vad típusú *Ore-R* törzzsel kereszteztük be a vonalakat és így az utódok felében tudtuk vizsgálni a P elem helyét.

2.8. Transzformálás:

A transzgének légybe transzformálását az EMBL Fejlődésgenetikai Intézetében működő transzformáló szolgálat végezte.

2.9. Kutikula preparálás embriókon:

A petéket először vízzel mostuk, hogy eltávolítsuk a hozzájuk tapadt táptalaj darabokat. Ezután 2-3 percig 2%-os NaClO oldatban áztattuk a petéket, hogy eltávolítsuk a koriont. A pete háti függelékeinek feloldódása, eltűnése jelezte, hogy a korion leoldódott. Ezt követően a petéket kétszer-háromszor vízzel mostuk, hogy eltávolítsuk a NaClO-ot. A korion nélküli petéket ecsettel lehalásztuk és itatóspapírral a lehető legtöbb vizet eltávolítottuk az ecsetről. Tárgylemezre helyeztük a petéket és Hoyer's: 60%-os tejsav 1:1 arányú keverékét csöppentettünk rájuk, majd fedőlemezzel lefedtük és a preparátumokat minimum 1 órán át 60°C-on inkubáltuk. A kutikula preparátumok kiértékelése sötétlátóteres mikroszkópban történt.

2.10. F aktin festés rhodaminnal jelölt falloiddinnel ováriumon:

Az ováriumokat 22°C-on tenyésztett nőstényekből boncoltuk ki. Boncolás 0,1%-os Triton PBS-ben (PBT). Fixálás 20 percig paraformaldehidre 4%-os PBS-ben.

Mosás 10 percig PBT-ben. Sötétben 1 ½ óráig inkubáltuk az ováriumokat PBT-ben hígított (hígítás 1:250) rhodaminnal jelölt phalloidinnel. Ezt 20 perces mosás követte PBT-vel. A tárgylemezre montírozás glicerinben oldott 4%-os n-propil gallátban történt. A kiértékelést konfokális lézermikroszkóppal végeztük.

2.11. BicD fehérje antitesttel történő kimutatása ováriumban:

A petefészkeket PBT-ben (PBS + 0,1 % Triton X-100) boncoltuk ki, majd fixáló oldatba raktuk (fixáló oldat: 835 μ l Mix / 20 mM KH_2PO_4 pH6,8, 90 mM KCl, 30 mM NaCl, 4 mM MgCl_2 / + 165 μ l 37 %-os formaldehid + 600 μ l heptán) és 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután kétszer 5 percig mostuk PBT-vel. Az ováriumokat metilalkohol (MetOH):dimetilszulfoxid (DMSO) 9:1 arányú keverékével permeabilizáltuk -20°C-on minimum 15 percen keresztül. Kétszer 5 percig mostuk PBT-vel. A mintát ezután BBT-ben (0,5 % BSA + PBT) blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A patkány anti-BicD elsődleges antitestet BBT-ben hígítottuk (200X) és ráértük a mintára. Szobahőmérsékleten egy éjszakán át inkubáltuk a mintát az elsődleges ellenanyaggal, majd háromszor 10 percig mostuk a mintákat BBT-vel. Ezután ismét blokkoltuk a mintát BBT-ben (+ 10 % normál kecske szérum) 30 percen keresztül. A fluoreszcens festékkel (FITC) jelölt számár-anti-patkány másodlagos ellenanyagot BBT-ben hígítottuk (200X) és a mintára ráérve sötétben 1 órán keresztül inkubáltuk. Ezután 3X 10 percig mostuk a mintát PBT-ben. A tárgylemezre montírozás glicerinben oldott 4%-os n-propil gallátban történt. A kiértékelést konfokális lézermikroszkóppal végeztük.

2.12. Karioszóma festés propidium jodiddal:

A propidium jodidos festési eljárás önállóan, illetve bármely szokásos antitest festésnél használható. Általában az antitest festés utolsó mosása után alkalmazzuk. A mintát 1 órán keresztül inkubáltuk PBT-ben hígított 0.4mg/ml-os RNáz A-val. Ezután egy rövid mosást követően 20 percig inkubáltuk a mintákat PBT-ben hígított 50 µg/ml koncentrációjú propidium jodiddal. Kétszer 10 percig mostuk PBT-vel. A tárgylemezre montírozás glicerinen oldott 4%-os n-propil gallátban történt. A kiértékelést konfokális lézermikroszkóppal végeztük.

2.13. Felhasznált molekuláris módszerek az *osk* gén analízisében:

2.13.1. Primerek az *osk* gén 5' régiójának analíziséhez:

A szakirodalomban elfogadott szabály szerint a szekvencia hivatkozásoknál és ábrázolásnál az orientáció a következő: a szekvenciákat 5'-3' irányban írjuk fel, a transzlációs iniciációs kodon előtti részt (5' irány, upstream) a transzlációs iniciációs kodonhoz képest bal oldalt tüntettük fel, míg a transzlációs iniciációs kodon után következő szakaszt (3' irány, downstream) a transzlációs iniciációs kodonhoz képest jobb oldalon tüntettük fel. A felső szál írását indító primereket F, az alsó szál írását indító primereket A betűk jelzik. A felső szál primerei: p[oskprmF] (5'- CATCATAA AGGAGTTAGCCAT -3'), p[oskprmF2] (5'- TCTGCAATTAAGGCAAGGCTAG -3'), p[oskprmF3] (5'- TTTGTGTAATGGTCGTCAAATG 3'), p[oskprmF5] (5'- TA ACGCTCGTCGGCACC -3'), p[oskprmF6] (5'- TTTCAGGTGCACTTGCTGTGTA TG -3'). Az alsó szál primerei: p [oskpromA] (5'- GTATTGGTGCTGGTATAACTG ATC -3'), p [oskpromA2] (5'- TCAAAGCAGTCTACGTAG -3'). A pZ primer a P elem terminális ismétlődő szakaszára specifikus és irányultságát tekintve a P elemből kifelé mutat.

2.13.2. Polimeráz láncreakció (PCR):

50 μl -es reakcióhoz a következő komponenseket mértük össze 50 μl -es PCR csövekbe: 0,5 μl mind a négy dNTP-ből (10 mM törzsoldat), 0,5 μl mindkét (F és A) primerből (100 ng/ μl), 5 μl 10X puffer, 0,5 μl (2 unit) Taq polimeráz, 4,5 μl minta DNS (~1 μg), és 37 μl desztillált víz (dH₂O). A PCR készüléken (Perkin Elmer Robo-Cycler) a következő programot használtuk. *Első ciklus*: denaturálás 94°C-on 3 percig, *35 cikluson keresztül*: denaturálás 94°C-on 1 percig, annealing 55°C-on 1 percig, extenzió 72°C-on 2 percig, *a 36. ciklusban*: extenzió 72°C-on 5 percig.

2.13.3. Inverz PCR:

2.13.3.1. A genomikus szekvencia hasítása SspI restrikciós enzimmel:

20 μl -es reakciót mértünk össze: 2 μl 10X puffer oldat, 1 μl SspI restrikciós enzim, 12 μl dH₂O, 5 μl genomikus DNS. A reakciót 2 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, majd 15 percig 65°C-on hőinaktiváltuk.

2.13.3.2. Ligálás:

A ligálási reakcióhoz (400 μl) a következőket mértük össze: 10 μl SspI emésztés, 40 μl 10X ligáló puffer, 2 μl ligáz, 348 μl dH₂O. A reakciót 4°C-on inkubáltuk éjszakán át. A következő lépésben fenol-kloroform extrakciót végeztünk. A vizes fázist (400 μl) új Eppendorf csőbe raktuk és 40 μl 3 M-os Na-acetátot mértünk hozzá, majd összekevertük az elegyet. Hozzáadtunk 900 μl etilalkoholt (EtOH). A DNS kicsapását -80°C-on végeztük 30 perces inkubálással. A csövet 10 percig centrifugáltuk 14000 rpm-mel szobahőmérsékleten. A pelletet 70%-os EtOH-lal mostuk. Rövid vákuumszáritás (SpeedVac) után 100 μl dH₂O-ban oldottuk fel a DNS-t.

2.13.3.3. A PCR-es lépés:

A PCR reakcióban használt primerek szekvenciái: p[oskprmF7] (5'- GCGCG AATTC TTAACCTAATGG TGGGCGAATG -3') az aláhúzott szekvencia a EcoRI hasító helyet jelöli, p[oskprmF8] (5'- GCGCAAAGCTTTTGCGCCTGCTCTTTCGCC TTC -3') az aláhúzott szekvencia a HindIII hasító helyet jelöli, a p[oskprmA2] (5'- C GCAG ATCTTCAAAGCAGTCTACGTAGCCAG -3') az aláhúzott szakasz a BglII hasító helyet jelöli, p[oskprmA5] (5'- GCGCAGATCTTTTGTTCCTTCGCCCCAC CAT -3') az aláhúzott szekvencia szakasz a BglII hasító helyet jelöli. A PCR reakciót a Polimeráz láncreakció leírásnak megfelelően végeztük.

2.13.3.4. Kettős emésztés EcoRI és BglII restrikciós enzimekkel:

30 μ l-es reakcióhoz a következő komponenseket mértük össze: 3 μ l EcoRI puffer, 7 μ l PCR reakció, 0,5 μ l BSA, 1 μ l EcoRI restrikciós enzim, 2 μ l BglII restrikciós enzim, 16,5 μ l dH₂O. A reakciót 1 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk.

2.13.3.5. Klónozás:

Az EcoRI, BglII kettős emésztés termékét 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk és a PCR terméket gél tisztítottuk. A ligálást 10 μ l-es reakcióban mértük össze: 7 μ l inszert, 1 μ l pSP72 klónozó vektor (előzőleg kettős emésztés EcoRI-BglII enzimekkel), 1 μ l ligáz, 1 μ l 10X ligáló puffer. Ligálás éjszakán át szobahőmérsékleten.

2.13.3.6. Elektrotranszformálás:

50 μ l kompetens sejthez hozzáadtunk 1 μ l-t a ligálási reakcióból, majd 10 percig jégre raktuk a sejteket. Ezután a sejteket transzformáló küvetába pipettáztuk és 2,5 kV feszültséggel kezeltük. Hozzáadtunk 1 ml TB tápfolyadékot, majd visszamér-

tük az Eppendorf csőbe. A sejteket ½-1 óránkeresztül 37°C-on rázattuk, majd ampicillin (Amp) antibiotikumot tartalmazó LB táptalajra szélesztettük ki. A lemezeket 37°C-on éjszakán át inkubáltuk.

2.13.3.7. MiniPrep és MidiPrep:

A MiniPrep és MidiPrep elkészítése Quiagene kittel és gyári Quiagene protokollnak megfelelően történt.

2.13.3.8. Szekvenálás:

A szekvencia meghatározásokat minden esetben az EMBL szekvenáló szolgálata végezte.

2.13.4. A Northern blotnál használt eljárások:

2.13.4.1. Totál RNS preparálás:

100 db kifejlett legyet 3 ml homogenizáló pufferben (8M urea, 3M LiCl, 5mM DTT, 5mM EDTA) Brinkman homogenizátorral homogenizáltuk. Ezután a homogenizátumot 3000 rpm-mel 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót 15 ml-es corex csőben éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Másnap SS34-es rotorral 12000 rpm-mel 30 percig 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, a pelletet 3 ml pufferben (10mM Tris pH7, 5mM EDTA, 0,5% SDS) oldottuk fel. Ezt fenol extrakció követte. A felülúszót (kb. 3 ml) 15ml-es csőbe raktuk és hozzáadtunk 300 µl 1 M-os nátrium acetátot (NaAc) és 7 ml 95%-os EtOH-t. Az RNS kicsapása -20°C-on 2 órán át tartott. Ezután centrifugálás következett 3000 rpm-mel 15 percig 4°C-on. A felülúszót eltávolítottuk. A pelletet kétszer mostuk 70%-os EtOH-ban, ami 0,3 M NaAc-ot tartalmazott, majd ugyan ilyen oldatban -20°C-on tároltuk.

2.13.4.2. PolyA⁺ mRNS prepalálás totál RNS-ből (QUIAGENE Oligotex protokoll):

50-100 μ l totál RNS-t 10 percig centrifugáltunk. A pelletet feloldottuk 500 μ l dH₂O-ban. Hozzáadtunk 500 μ l 2X kötő puffert (20mM Tris pH7½, 1M NaCl, 2mM EDTA, 0,2% SDS). Ezután hozzáadtuk a 37°C-on előmelegített oligotex gyöngyöt. Három percig 65°C-on, majd 10 percig szobahőn inkubáltuk. Két percig maximális sebességgel centrifugáltuk (asztali centrifuga). Gondosan eltávolítottuk a felülúszót. A gyöngyöt kétszer mostuk 1 ml mosó pufferrel (10 mM Tris pH7,5, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA), majd újra lecentrifugáltuk (2 percig maximális sebességgel) és a felülúszót eltávolítottuk. A polyA RNS-t kétszer eluáltuk 20 μ l 70°C-on előmelegített eluáló pufferrel (2 mM EDTA), ami után 2 perc centrifugálás következett maximális sebességgel. Óvatosan átpipettáztuk a felülúszót egy új csőbe. Kiegészítettük 100 μ l-re dH₂O-val, majd hozzáadtunk 10 μ l 3 M NaAc-ot és 340 μ l 100%-os EtOH-t. A mRNS-t -20°C-on csaptuk ki minimum 2 órás inkubálással. Az RNS-t -20°C-on tároltuk.

2.13.4.3. Formaldehid gél készítés és minták futtatása:

1.5 %-os agaróz gélét készítettünk. 200 ml gélhez összekevertünk 3 g agarózt, 20 ml 10X MOPS-t (Összetétel 1 liter végtérfogathoz: 41.86 g MOPS /3-(N-morpholino) propánszulfonilsav/, 4,1 g vízmentes NaAc, 20 ml 0,5 M EDTA pH=8. A MOPS pH-ját NaOH-dal állítottuk 7-re és alufóliába tekert üvegben sötétben tároltuk) és ehhez 146 ml dH₂O-t adtunk, majd melegítettük míg az agaróz fel nem oldódott. Az agarózt kb. 50°C-ra hűtöttük és hozzáadtunk 34 ml formaldehidet (12,3 M). Jól összekevertük és fülke alatt kiöntöttük a gélét. Hagytuk megdermedni, majd 1X gélfuttató pufferbe raktuk (0,02 M MOPS pH7, 8 mM NaAc, 1 mM EDTA pH8). Az RNS mintákat 12 μ l Northern mintapufferben vettük fel (3,5 μ l dH₂O, 5 μ l formamid, 1,5 μ l

10X MOPS, 2 μ l formaldehid). A mintákat 5 percig 65°C-on melegítettük, majd jégre raktuk és hozzáadtunk 3 μ l festéket (1X MOPS, 15% fikoll, Brómfenol kék). A minták géltre történő felvitele előtt a gél 5 percig előfuttatott (5 V/cm). A mintákat éjszaka át futtattuk 30 V-on fülke alatt.

2.13.4.4. Elektrotranszfer:

A gél 2-szer 10 percig 0,3X Tris-acetát EDTA pufferben (TAE, 1X TAE = 0,04M Tris-acetát és 0,001M EDTA) mostuk. A membránt (GeneScreen Hybridization Transfere Membrane - Dupont) méretre vágtuk. Az elektroblottoló tankját 0,3X TAE-vel töltöttük fel. A membránt óvatosan a géltre helyeztük (sorrend: pozitív pólus, membrán, gél, negatív pólus). Feltöltöttük a tankot, míg a puffer teljesen el nem fedte a gél. A transzfer 50 V-tal 4°C-on 5-6 órán át tartott, közben mágneses keverővel kevertük a puffert. A transzfer után a membránt Whatmann szűrőpapíron szárítottuk 15 percen át. A membránt 1 percig UV lámpával megvilágítottuk, ami az RNS-t keresztkötésekkel véglegesen a membránhoz rögzítette. A membránt Whatmann szűrőpapírok között tároltuk.

2.13.4.5. Radioaktívan jelölt próba elkészítése (random primed):

Boehringer protokoll alapján: 100-500 ng gélisztitott DNS mintát 9 μ l térfogatban vettük fel (5 μ l DNS + 4 μ l dH₂O). 2-3 percig forraltuk, majd jégre raktuk. Szobahőmérsékleten hozzáadtuk a következő komponenseket: 2 μ l reakció mix (puffer és hexamer), 1-1 μ l dATP, dGTP, dTTP, 5 μ l 3000 Ci/mmol specifikus aktivitású alfa^[P32]dCTP, 1 μ l Klenow (2 unit/ μ l). A reakció elegyet (20 μ l) 30 percig inkubáltuk 37°C-on. A Sephadex G50 oszlopot 2X 1 percig centrifugáltuk asztali centrifugán

2700 rpm fordulatszámmal. Az oszlopra rámértük a reakció elegyet és 4 percig centrifugáltuk ugyan ezzel a sebességgel. A jelölt próbát 4°C-on tároltuk.

2.13.4.6. Hibridizáció:

Prehibridizáció: A membránt hibridizáló csőbe helyeztük és Church puffert (200 ml oldathoz: 100 ml 1M-os Na-foszfát + 400 μ l 0,5 M EDTA + 70 ml 20%-os SDS pH7,2, ezt 200 ml-re feltölteni dH₂O-val) mértünk rá. A prehibridizáció 20 percig 55°C-on hibridizációs kályhában történt. Ezután kiöntöttük a Church puffer nagy részét és a csőben az eredeti mennyiség kb. 1/5-ét hagytuk benne.

Hibridizáció: 10 μ l jelölt próbát raktunk Eppendorf csőbe és 3 percig 90°C-on melegítettük, majd jégre tettük a csövet. A próba hozzáadása után a hibridizálást éjszakán át 55°C-on végeztük. A membránt 2X 10 percig 50 mM-os Na-foszfáttal mostuk szobahőmérsékleten. A membrán exponálását éjszakán át -80°C-on végeztük, majd előhívtuk a filmet.

2.14. RNS in vitro transzkripció és DIG (digoxigenin) jelölés (módosított Boehringer eljárás):

2.14.1. A DNS linearizálása:

Az *osk* cDNS a BS KS mínusz plazmidba volt klónozva. A plazmid linearizálása HindIII (MBI Fermentas) restrikciós enzimmal történt. 100 μ l-es reakcióba a következőket mértük össze: 5 μ l plazmid DNS, 10 μ l 10X enzim puffer, 0,5 μ l BSA (20 mg/ml), 83,5 μ l dH₂O, 1 μ l HindIII restrikciós enzim. A reakciót egy órán át 37°C-on inkubáltuk. A 100 μ l-es reakcióhoz hozzáadtunk 100 μ l fenol-kloroform elegyet, összekevertük (vortex) és 4°C-on 4 percig centrifugáltuk asztali centrifugán. A felső fázist (100 μ l), ami a linearizált DNS-t tartalmazta új Eppendorf csőbe raktuk. Hoz-

záadtunk 50 μ l 5M-os ammóniumacetátot (NH_4Ac) és 300 μ l -20°C -os EtOH-t majd összekevertük. A DNS -20°C -on csaptuk ki 30 perces inkubálással. A DNS-t 15 percig 4°C -on centrifugáltuk, majd 1 ml -20°C -os 70%-os EtOH-al mostuk. A DNS-t 5 percig 4°C -on centrifugáltuk, majd az alkoholt eltávolítva 5 percig vákuum szárítottuk (SpeedVac). Ezután 11 μ l dH_2O -ban oldottuk fel a DNS-t.

2.14.2. DIG jelölt antiszensz RNS transzkripció linearizált DNS mintáról:

20 μ l-es térfogatban összemértünk: 2 μ l 10X reakció puffer, 7 μ l dH_2O , 2 μ l dNTP keverék (DIG-dUTP), 6 μ l linearizált DNS, 1 μ l RNáz inhibitor, 2 μ l T7 RNS polimeráz. Összekevertük az elegyet és 2 órán keresztül 37°C -on inkubáltuk. Hozzáadtunk 2 μ l RNáz mentes DNáz I-et és 15 percig 37°C -on inkubáltuk. Hozzáadtunk 2 μ l EDTA-t (0,2 M, pH8), hogy leállítsuk a reakciót. A reakcióhoz hozzámértünk 2,5 μ l 4 M-os LiCl-ot és összekevertük a reakcióeleggyel. Hozzáadtunk 75 μ l -20°C -os EtOH-t és jól összekevertük. Az RNS kicsapása -70°C -on történt 30 perces inkubálással. Az RNS-t 5 percig centrifugáltuk asztali centrifugán, majd 50 μ l -20°C -os 70%-os EtOH-al mostuk. Az alkoholt eltávolítva szobahőmérsékleten szárítottuk az RNS-t és 100 μ l dH_2O -ban oldottuk fel, amihez 1 μ l RNáz (20 unit/ μ l) inhibitorot adtunk.

2.15. DIG jelölt osk antiszensz RNS in situ hibridizálás ováriumon:

Az ováriumokat 22°C -on tenyésztett nőstényekből boncoltuk ki. Boncolás PBT-ben (0,1% Tween20 PBS-ben). Fixálás 4%-os paraformaldehiddel (PBS-ben) 20 percen keresztül. Ezt 2X 10 perces mosás követte PBT-vel. Proteináz-K kezelés (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) következett 45 percen keresztül. Mosás kétszer 5 percig PBT-vel. Utófixálás 20 percen keresztül 4%-os paraformaldehiddel. Mosás PBT-vel kétszer 5 percig. A mintákat -20°C -os MetOH:DMSO 9:1 arányú keverékébe tettük legkevesebb fél órára.

Mosás PBT-vel háromszor 5 percig. Prehibridizálás PBT:Hibridizációs Puffer (HP= 50% formamid, 5 X SSC, 100 $\mu\text{g/ml}$ tRNS, 50 $\mu\text{g/ml}$ heparin, 0,1% Tween20, pH4,5-re állítani citromsavval) 1:1 arányú keverékével 30 percig és HP-vel 30 percig 60°C-on. Hibridizáláskor a mintára mérünk 60°C-ra előmelegített 100 μl HP-t és 1-5 μl DIG jelölt teljes hosszúságú *osk* antiszensz RNS próbát. Hibridizálás 60°C-on éjszakán át. Mosás háromszor, előmelegített HP-vel 20 percig 60°C-on. Mosás előmelegített PBT:HP 1:1 arányú keverékkel 20 percig 60°C-on és mosás háromszor PBT-vel 20 percig szobahőmérsékleten. Ezután a mintákat átraktuk festő oldatba (50 ml-hez: 1 ml 5 M-os NaCl, 2,5 ml 1 M-os MgCl_2 , 1 ml 5 M-os Tris pH9,5, 46 ml dH_2O). A színreakcióhoz a festő oldathoz hozzámértük az NBT-t (nirtoblue tatrazolium) és az X-foszfátot (5-bromo-4-kloro-3-indolyl foszfát) (10 ml festő oldat + 45 μl NBT + 35 μl X-foszfát) és a mintát beletettük a szubsztrátot tartalmazó festő oldatba. A színreakciót sötétben inkubáltuk szobahőmérsékleten és a jel megjelenése után 10 mM-os EDTA-val (PBT-ben oldva) állítottuk le többször átmosva a mintákat. A tárgylemezre montírozás Aqua Polymount (Polysciences) polimerrel történt.

2.15.1. Az *osk* RNS fluoreszcens festékekkel való megjelölése:

Az antiszensz *osk* RNS fluorokrómmal való jelölése a Molecular Probes fehérje jelölési protokolljának RNS-re történő adaptálásával történt (Glotzer et al., 1997).

2.15.2. Fluoreszcens jelölt *osk* RNS *in situ* hibridizáció ováriumon:

A leírás hasonló a DIG jelölt *osk* antiszensz RNS *in situ* hibridizálási protokollal. Az alábbiakban csak az eltéréseket tüntettük fel. Hibridizáláskor a mintára mérünk 60°C-ra előmelegített 100 μl HP-t és 1-5 μl rhodamin jelölt, teljes hosszúság-

gú *osk* antiszensz RNS próbát. Hibridizálás 60°C-on éjszakán át. Mosás háromszor, előmelegített HP-vel 20 percig 60°C-on. Mosás előmelegített PBT:HP 1:1 arányú keverékkel 20 percig 60°C-on és mosás négyszer PBT-vel 20 percig szobahőmérsékleten. A tárgylemezre montírozás glicerinen oldott 4%-os n-propil gallátban történt.

2.16. Reverz transzkripció (RT) PCR teszt *Gal4* aktivált *UASp-osk* riporter gént tartalmazó mintákban:

A kísérletben felhasznált törzsek: *UOK-5/NGT40*; *oskA87/Df*, *UOK-5/+*; *Gal4VP16-A87/Df*, *SM6b/+*; *Gal4VP16-A87/Df*, *Ore-R* (vad típus).

Az adott genotípusú nőstényekből totál RNS-t izoláltunk. Ezt követte a reverz transzkripció, majd a PCR-es lépés. A PCR termékeket 1,5%-os agaróz gélen futtattuk TBE pufferben. A PCR-ben használt primerek az *osk* gén 418 bp hosszú szakaszát amplifikálják fel. A felső szál primere p[oskE1F] (5'- AAGGTGCCATTGGTGGCC CATG -3') az első exonban van, az alsó szál primere p[oskE2A] a második exonban van (5'- CATATCCAGGAGGTGACCGTTC 3').

2.16.1. Reverz transzkripció:

A reakcióhoz a következőket mértük össze: 5 µl random hexamer (50 µg/ml), 5 µl totál RNS. 10 percig 70°C-on inkubáltuk, majd 5 percre jégre raktuk. A reakcióhoz a következőket adtuk hozzá: 10 µl 5X reakció puffer, 4 µl 10 mM-os dNTP, 0,5 µl RNáz inhibitor, 3 µl MMLV RT enzim, 22,5 µl dH₂O. Egy órán keresztül inkubáltuk a reakciót 37°C-on, majd 5 percen át 70°C-on hőinaktiváltuk és jégre raktuk. PCR reakcióhoz 1-2 µl-t használtunk az elegyből.

2.16.2. PCR-es lépés:

A PCR reakcióban használt primerek: oske1F (5'- AAGGTGCCATTGGTGG CCCA TG -3'), oske2A (5'- GTATAGGTCCTCCACTGGCAAG -3'). 50 µl-es reakcióhoz a következő komponenseket mértük össze: 5 µl 10X puffer, 5 µl MgCl₂, 1-1 µl F és A primer (100 ng/µl), 0,5 µl Taq polimeráz, 0,5 µl dNTP keverék, 36 µl dH₂O, 1 µl cDNS.

2.17. Mikroszkópos kiértékelés:

Mikroszkópok: Zeiss Axiophot + CCD kamera, EMBL saját fejlesztésű és építésű konfokális lézermikroszkóp, Zeiss konfokális lézermikroszkóp (40X-es és 100X-os nagyítású objektívek) + CCD kamera.

2.18. Internetes adatbázisok és szolgáltatások:

Flybase: www.ebi.ac.uk:7081

Berkeley Drosophila Genome Project: www.fruitfly.org/

GadFly: www.fruitfly.org/annot/index.html

PubMed(Medline): www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/

2.19. Felhasznált szoftverek:

Molekuláris biológiai szoftver: DNASTAR (DNASTAR Inc.)

A digitalizált képek nyomdai előkészítése, összetett ábrák elkészítése: Adobe Photoshop (Adobe Inc.); CorelDRAW! (Corel Corp.)

Szövegszerkesztés, táblázatok és grafikonok készítése: MS Office csomag (Microsoft).

Referencia adatbázis kezelés: Reference Manager (ISI Research Soft).

Internet böngésző: Netscape Communicator (Netscape Inc.).

3. Eredmények:

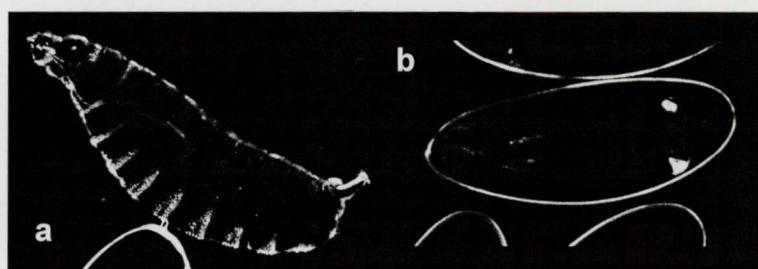
3.1 A P elemes mutánsgyűjtemény előállítása:

A P elem inszerciókat előállító mutagenézis kísérlet egy éves időtartama alatt több mint 30000 új P elem inszerciót hordozó kromoszómát hoztunk létre. Az előállított vonalakat megvizsgáltuk letális, steril és unokátlan (*gs= grandchildless*) fenotípusokra. Létrehoztunk egy 4000 vonalból álló homozigóta letális mutáns gyűjteményt, egy 500 vonalból álló steril gyűjteményt, és egy 17 tagú unokátlan mutáns csoportot (4. ábra). A mutagenézis elsődleges célja új unokátlan mutánsok izolálása volt, amit sikeresen teljesítettünk (Erdélyi et al., 1995). A mutánsgyűjtemény alábbi tagjainak részletes analizisét végeztük el és ezekből a következő közlemények születtek: a *vasa* [Tomancak, P; Guichet, A; Závorszky, P; Ephrussi, A: Oocyte polarity depends on regulation of *gurken* by *Vasa*, Development 125(9): 1723-1732, (1998)], a *fushi tarazu Factor 1 (ftz-F1)* [Guichet, A; Copeland, JWR; Erdélyi, M; Hlousek, D; Závorszky, P; Ho, J; Brown, S; Percival-Smith, A; Krause, HM; Ephrussi, A: The nuclear receptor homologue *Ftz-F1* and the homeodomain protein *Ftz* are mutually dependent cofactors, Nature 385: 548-552 (1997)] és az új *osk* allélek (Závorszky, P; Jenny, A, St Johnston, D, Erdélyi, M, Ephrussi, A: Structural role of *osk* mRNA during oogenesis, Közlés alatt).

Dolgozatom az *osk* mutánsok analizisét mutatja be, ami az EMBL-ben (European Molecular Biology Laboratory) Dr. Anne Ephrussi laboratóriumában és az SZBK Genetikai Intézetében Dr. Erdélyi Miklós laboratóriumában végzett munkáimon alapul.

3.2 A steril mutánsgyűjtemény szűrése abdomen hiányos fenotípusra:

A sterilitás egyik lehetséges oka a poláris plazma elégtelen működése, vagy hiánya, ami az esetek többségében, az abdomen hiányával is együtt jár. Ismert, hogy az *osk* génnek kulcsszerepe van a poláris plazma kialakításában. Az 500 steril vonal által rakott petéket szisztematikusan megvizsgáluk és abdomen hiányos embriókat kerestünk (7. ábra).



7. ábra. Kutikula preparátumok sötétlátóteres mikroszkópos felvételen. Az **a** panel egy vad típusú embriót, a **b** panel egy abdomen hiányos mutáns embriót (187) mutat.

Az 500 vonalból összesen 8 vonal mutatta a tipikus abdomen hiányos fenotípust, kettő pedig pair-rule fenotípust. A későbbi vizsgálatok megmutatták, hogy a pair-rule fenotípusú mutánsok a *ftz-F1* gén két új mutáns allélját képviselik (Guichet et al., 1997).

3.3 Az abdomenhiányos fenotípusú mutációk komplementációja ismert poszterior mutánsokkal:

A 8 abdomen hiányos steril vonalat már ismert poszterior csoportba tartozó mutánsokkal komplementáltattuk, hogy kiderítsük vannak-e közöttük új géneket azonosító mutánsok. A komplementációs keresztezésekből kiderült, hogy a 8 abdomen hiányos vonalból 5 nem komplementálta az *osk*⁵⁴ allélt, azaz allélikusak az *osk-ral*, 2 nem komplementálta a *vasa* allélt (Tomancak et al., 1998), és egy a *stau* allélt. Tehát mindannyian eddig már ismert géneket képviselnek. Mivel laboratóriumunk egyik fő

profilja az *osk* gén tanulmányozása, a továbbiakban az új *osk* mutánsok analizisére koncentráltunk. Az új *osk* mutánsok törzsbe állításakor, mind az öt esetben, egy eddig nem ismert *osk* fenotípust mutattak. Ezt különösen fontosnak ítéltük, mivel az új fenotípus az *osk* fehérje null mutánsokénál erősebbnek bizonyult. A dolgozatomban az új fenotípus részletes analizisét mutatom be.

3.4 Az új *osk* mutánsok P elemeinek kromoszómára térképezése és a mutagenézisben résztvevő kromoszómák lecserélése:

A mutagenézisben résztvevő kromoszómák lecserélése lehetővé tette, hogy a továbbiakban csak a P elem inszerciót hordozó kromoszómák tulajdonságait vizsgáljuk. A kromoszómára történő térképezést és a mutagenézisben résztvevő kromoszómák lecserélését ugyanabban a keresztezésben végeztük. Az *osk* gén a 3. kromoszóma jobb karján helyezkedik el és a kromoszómára történő térképezéssel mind az öt *osk* mutáns esetében sikerült kimutatni, hogy a P elemek a 3. kromoszómára térképeződnek. Általános tapasztalat a P elemes mutáns gyűjteményeknél, hogy a mutációk mintegy felében nem a P elem felelős a mutációért. Ezért ellenőriztük, hogy az új *osk* mutánsok valóban P elem indukáltak-e.

3.5 A P elemek kiugratása az új *osk* vonalakból:

A P elemek kiugratásával ellenőrizni kívántuk, hogy a P elemek eltávolítása, kivágódása (excízió) befolyásolja-e a mutáns fenotípust. Olyan vonalakat kerestünk, melyek elveszítették a P elembe beépített w^+ szemszín markerét jelezve, hogy a P elem valószínűleg kivágódott. Mind az öt P elem inszerciót hordozó mutáns esetében találtunk olyan fehér szemszínű vonalakat (w/w ; $TM6b/osk^{ex}$), ahol az utolsó keresztezéséből (6. ábra) származó tesztelő w/w ; $Df\ p^{XT103}/osk^{ex}$ nőstények továbbra is sterilek

voltak. A P elem eltávolítása egyik törzs esetében sem befolyásolta a steril fenotípus megnyilvánulását, ami valószínűsíti annak lehetőségét, hogy nem P elem inszerció felelős a steril fenotípusért.

3.6 A P elemek elhelyezkedése az új *osk* mutánsok óriáskromoszómáin:

DIG jelölt P elem próbával, *in situ* hibridizációval mind az öt *osk* mutáns esetében megállapítottuk a P elem citológiai elhelyezkedését (1. táblázat). Mivel az *osk* lokuszban (85B) nem találtunk P elem hibridizációs jelet, ez megerősíti a P elem kiugratási kísérletből levonható következtetést, miszerint nem P elem inszerció okozta az új *osk* mutációkat.

<i>osk</i> mutánsok:	P elem hibridizációs jel:
187	87A (3R)
188	85D (3R); 94C-D (3R)
407	86A-B (3R); 87 (3R)
448	56D (2R); 68F (3L)
494	72-73 (3L)

1. Táblázat. P elem hibridizációs jelek az *osk* mutánsok óriáskromoszómáin. A számok és betűk az óriáskromoszómán elfoglalt helyet jelölik. A 3R a 3. kromoszóma jobb karját, a 3L a bal karját, a 2R a 2. kromoszóma jobb karját jelöli. Az *osk* gén a 85B lokuszba térképeződik.

3.7 Az új *osk* mutációk részletes komplementációs analízise:

Az *in situ* óriáskromoszóma hibridizáció eredménye és az új mutánsok *osk*⁵⁴-gyel mutatott allélizmusa közötti látszólagos ellentmondást további komplementációs kísérletben vizsgáltuk. E kísérlettől kezdve a keresztezésekben, tesztelésekben a *w*; +/+; *P[w⁺]/TM3* törzseket használtuk. Kíváncsiak voltunk, hogy vajon a lecserélt kromoszómákkal rendelkező vonalak továbbra sem komplementálják-e az *osk*⁵⁴-es fenotípust. Az öt *osk* mutánst (187, 188, 407, 448, 494) egymással, 2 már ismert erős

osk mutánsokkal és *osk* delécióval komplementációs keresztezésben teszteltük (2. táblázat).

	A87	187	188	407	448	494	<i>Df(3R)p^{xT103}</i>	<i>osk⁵⁴</i>	<i>osk⁸⁴</i>
A87	l								
187	ph	ph							
188	ph	ph	ph						
407	ph	ph	ph	ph					
448	ph	ph	ph	ph	ph				
494	ph	ph	ph	ph	ph	ph			
<i>Df(3R)p^{xT103}</i>	ph	ph	ph	ph	ph	ph	l		
<i>osk⁵⁴</i>	ah	ah	ah	ah	ah	ah	ah	ah	
<i>osk⁸⁴</i>	ah	ah	ah	ah	ah	ah	ah	ah	ah

2. Táblázat. Az újonnan izolált mutánsok és erős *osk* allélek komplementációs tesztje. A homozigóta és transzheterozigóta nőtények peterakását és a lerakott petékben fejlődő embriók abdomen hiányát vizsgáltuk (ph=pete hiánya, ah=abdomen hiánya, l=letális).

A kromoszóma cserét követően az öt *osk* mutáns homozigóta és transzheterozigóta nőtényei nem raktak petét. Az *osk* gént eltávolító deléciót és az újonnan izolált mutációkat hordozó nőtények ugyancsak nem raktak petét. Ez az eredmény kétféleképpen értelmezhető. Vagy az *osk* gén közvetlen közelében, az *osk* génnel együttműködő génben történt mutáció, vagy az *osk* gén mutációjának egy új fenotípusával van dolgunk.

Ez utóbbit támasztotta alá, hogy Cambridge-i kooperációs partnerünk egy röntgen besugárzással végzett mutagenézis kísérletében az új *osk* mutánsainkhoz nagyon hasonló fenotípusú mutánt talált. Ezt az A87 jelű mutánt a 3. kromoszómára térképezték. Az új A87 mutációt az *osk⁵⁴*-gyel transzheterozigóta formában hordozó

nőstények által rakott petékben az embriók abdomen hiányos fenotípust mutattak. Azok a nőstények, akik az *A87* mutációt és az *osk* deléciót hordozták, nem raktak petét. Az *A87* mutáció homozigóta formában letális, amit feltehetőleg egy, a harmadik kromoszómán elhelyezkedő, az *A87* mutációtól független (second site) letális mutáció okoz. Mivel *A87* fenotípusa és az általunk izolált 5 mutáns fenotípusa nagyon hasonlított, elkértük az *A87*-es mutánst, hogy komplementációs keresztezésben teszteljük az öt *osk* mutánsunkkal. A komplementáció eredményét a 2. táblázat mutatja. Kiderült, hogy az *A87* és az öt *osk* mutáns jelölt ugyanabba a komplementációs csoportba tartozik, azaz allélikusak. Megállapodás szerint az *osk^{A87}* mutánst a továbbiakban az általunk izolált öt *osk* mutánssal együtt közösen vizsgáltuk. A már ismert *osk⁵⁴* és *osk⁸⁴* mutációt és az új mutációkat transzheterozigóta formában hordozó nőstények olyan petét raktak, melyek tipikusan a poszterior csoportra jellemző abdomen hiányos fenotípust mutatták. Ez azt jelenti, hogy az *osk⁵⁴* és *osk⁸⁴* komplementálja az új *osk* mutánsok petét nem rakó fenotípusát. Tehát a részletes komplementációs analízis az eddigi legszigorúbbnak tartott *osk* fenotípusnál korábbi és erősebb fenotípusra derített fényt.

3.8 Menekítési kísérlet genomikus *osk* szekvenciával:

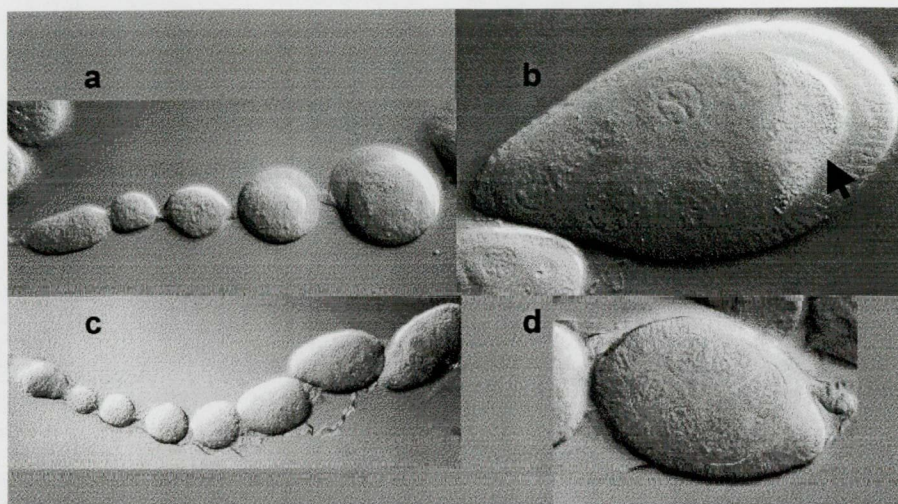
Mivel az új *osk* fenotípus maga és az új allélek komplementációs viselkedése is szokatlan, a komplementáció eredményét menekítési kísérletekkel erősítettük meg (3. táblázat). A $P(w^+ osk^+)$ transzgén az *osk* gén teljes genomikus szakaszát hordozza és az ismert erős *osk* mutánsok abdomen hiányos fenotípusát teljes mértékben menekíti. A $P(w^+ osk^+)$ transzgén az újonnan izolált *osk* mutáns menekítette, bizonyítva, hogy az újonnan izolált mutációk valóban az *osk* gént érintik. A mutánsokat *osk^{A87}*, *osk¹⁸⁷*, *osk¹⁸⁸*, *osk⁴⁰⁷*, *osk⁴⁴⁸*, *osk⁴⁹⁴* jelölésekkel használjuk a dolgozat hátralevő részében.

	transzgén nélkül	$P(w^+ osk^+)$ transzgén jelenlétében
A87	Steril	Fertilis
187	Steril	Fertilis
188	Steril	Fertilis
407	Steril	Fertilis
448	Steril	Fertilis
494	Steril	Fertilis
osk^{34}	Steril	Fertilis

3. Táblázat. Az újonnan izolált mutánsok menekítése *osk* genomikus szekvenciát tartalmazó $P(w^+ osk^+)$ transzgénnel. Jelölések: Steril= nincs fertilis utódjuk; nem raktak petét, illetve az osk^{34} esetében a petékben abdomen hiányos embriók fejlődtek; Fertilis= raktak petét és a petékből fertilis egyedek fejlődtek.

3.9 Az új *osk* mutánsok fenotípusának leírása:

Az újonnan izolált mutánsok (osk^{A87} , osk^{187} , osk^{188} , osk^{407} , osk^{448} , osk^{494}) legjellegzetesebb fenotípusa, hogy nem raknak petét. Ez az *osk* mutánsok esetében egy teljesen új, eddig még nem ismert fenotípus. A homozigóta és az *osk* delécióval transzheterozigóta nőstények petefészkeinek kiboncolásakor minden esetben alulfejtett, kisméretű petefészkeket találtunk. Feltűnő volt, hogy egyetlen esetben sem találtunk idősebb petekamrákat (8. ábra). A petefészkek leginkább egy hasonló méretű gyöngyszemekből álló gyöngyfűzérre hasonlítanak. Arra a kérdésre, hogy a petekamrák 14 stádiumra osztott fejlődési programjának melyik szakaszát érik el fejlődésben az újonnan izolált mutánsok petekamrái, a következő egyszerű kísérlet adott választ. Normális esetben a petekamra fejlődésének 8. stádiumában kezd a szikanyag (yolk) felhalmozódni a petesejtben. A szikanyagnak erős autofluoreszcenciája van, amit fluoreszcens mikroszkóppal könnyű detektálni. A szikanyaggal kitöltött petesejt No-

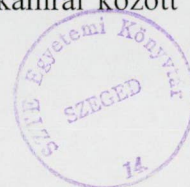


8. ábra. Fixált petefészkekből származó petekamrák Nomarski optikával fényképezve. Az **a** és **b** panel a vad típusú, a **c** és **d** panel a *osk¹⁸⁷*-es mutánsból származó petekamrákat mutatja. A fiatal (1-7. stádiumos) petekamrákat az **a** és **c** panel mutatja. A **b** panelen egy vad típusú 9. stádiumos petekamra látható. Fekete nyílhegy mutatja a szikanyaggal kitöltött petesejtet. A **d** panelen látható *osk¹⁸⁷* késői petekamrájában nincs szikanyag. A **b** és **d** panel nagyítása megegyezik.

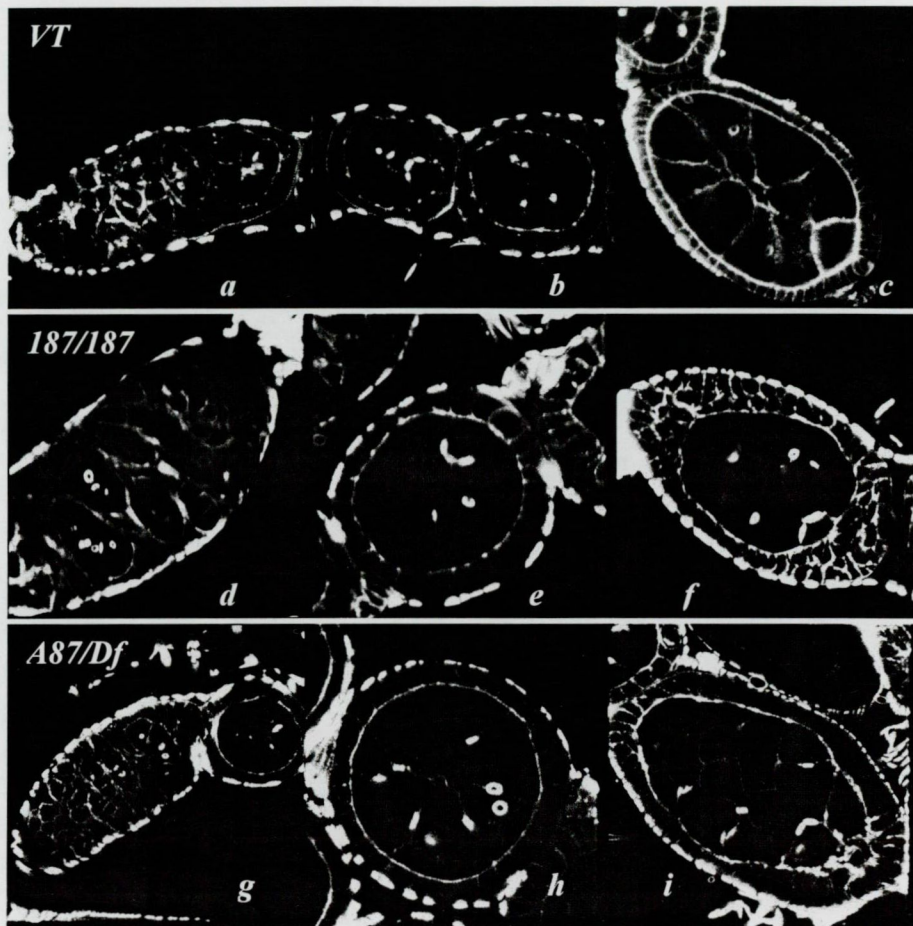
mariski optikával is jól megkülönböztethető a petesejtet körülvevő sejtektől. Az újonnan izolált *osk* mutánsok egyikénél sem sikerült megfigyelni a petesejtben a szikanyag jelenlétét (8. ábra). A mutánsok petekamrái tehát a fejlődésben nem jutnak el a szikanyag felhalmozásáig, azaz a 8-as stádiumig, ellentétben az *osk* fehérje null allélekkel, melyekben kialakulnak az érett peték.

3.9.1 A follikuláris sejtek rendellenes felhalmozódása:

A petekamrák morfológiájának részletesebb vizsgálatához rhodamin jelölt falloidinnal F aktin festést végeztük. Az *osk¹⁸⁷*, *osk¹⁸⁸*, *osk⁴⁰⁷*, *osk⁴⁴⁸* és *osk⁴⁹⁴* mutáns petekamrák F aktin festésének eredménye teljesen azonos volt. A petekamra fejlődésének első négy stádiumában a vad típusú *Ore-R* és a mutánsok petekamrái között



nem találtunk különbséget (9. ábra.). Az 5., 6., és 7. stádiumokban azonban lényeges különbségek mutatkoztak.



9. ábra. A petekamrák F aktin festése rhodamin jelölt falloidinnel. VT= vad típus (*Ore-R*). Az a, d, g képeken a germárium régió látható. A b, e, h képek 5-ös stádiumos petekamrákat mutatnak. A c, f, i képeken 7. stádiumos petekamrák láthatók.

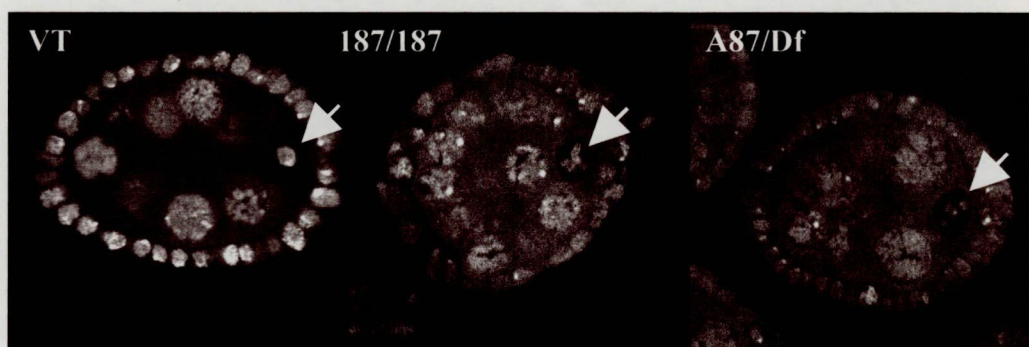
Az *osk*¹⁸⁷-es mutánsban az 5. stádiumtól kezdve szabálytalan alakú follikuláris sejtek jelentek meg, melyek a 7. stádiumban megnövekedett számmal a petekamra két pólusán halmozódtak fel (9. ábra.). Az *osk*^{A87} esetében a follikuláris sejtek a vad típushoz hasonló módon helyezkedtek el (9. ábra, 4. táblázat). A mutánsoknál a petecsőben a 6., 7. stádiumos petekamrákban nagy vakuólumok jelennek meg. Végül a petekamrák szétesnek és a maradványok felszívódnak, üresen hagyva a petecsövet.

	Egy sejt vastagságú follikuláris sejtréteg	Abnormális sejtfelhalmozódás	Kompakt karioszóma	Széteső karioszóma
+/+ (vad típus)	100	0	100	0
<i>osk¹⁸⁷/osk¹⁸⁷</i>	7	93	69	31
<i>osk^{A87}/Df</i>	97	3	6	94
<i>osk¹⁸⁷/osk^{A87}</i>	90	10	37	63

4. táblázat. Follikuláris sejtek és a karioszóma rendellenességek összehasonlítása *osk¹⁸⁷* és *osk^{A87}* mutánsok között. Genotípusonként 4 egyed összesen 100 darab 7. stádiumos petekamráját vizsgáltuk.

3.9.2 A karioszóma szétesése:

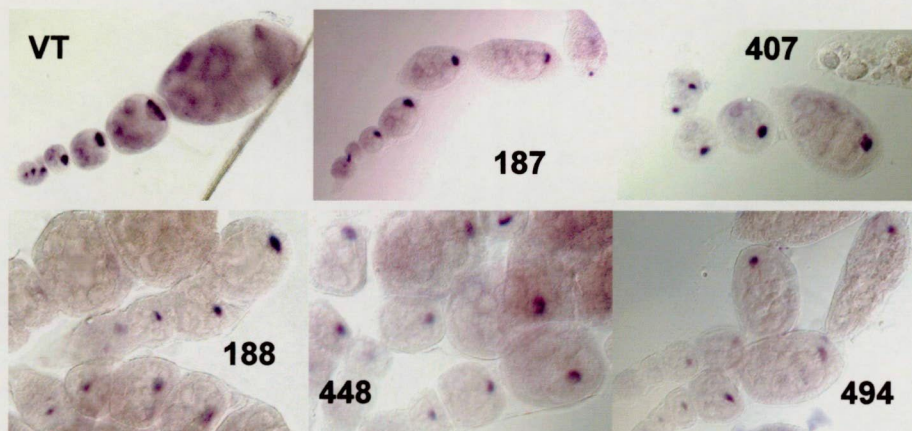
A karioszóma a kromoszómákat egy nagyon szorosan összecsomagolt állapotban tartalmazó, DNS-hez kapcsolódó festékekkel jól festődő, petesejtekre jellemző sejtmagi képlet. Vizsgálataink során a karioszóma festésére a floureszcens fénnel jól gerjeszthető propidium jodidot használtuk. A vad típusban a karioszóma gömbölyű alakú, míg az *osk^{A87}* és *osk¹⁸⁷* mutánsokban erősen fragmentált szerkezetet mutat (10. ábra, 4. Táblázat). A karioszóma szétesése a mutánsokban az összes petekamra fejlődési stádiumban megfigyelhető.



10. ábra. Karioszóma festés propidium jodiddal. VT= vad típus (*Ore-R*). Fehér nyílhegy mutatja a karioszómákat.

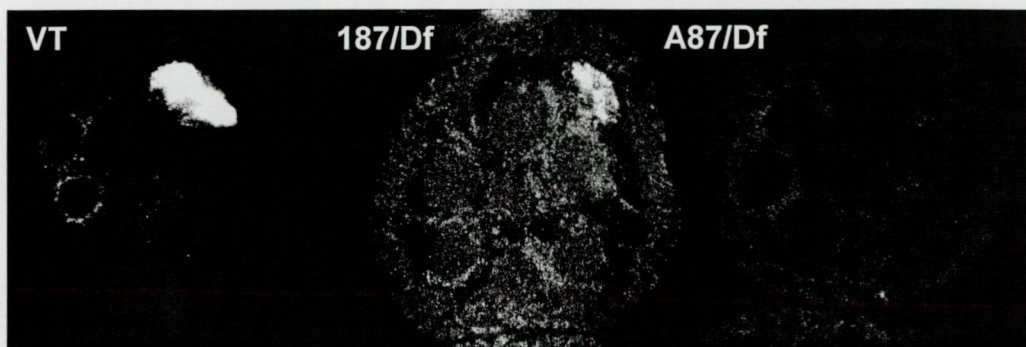
3.9.3 Az új *osk* mutánsokban az *osk* mRNA mennyisége nagy mértékben csökken, illetve hiányzik:

Osk RNS *in situ* hibridizációt végeztünk, ahol DIG jelölt antiszensz *osk* RNS próbát használtunk az *osk* RNS jelenlétének kimutatására a P elem mutagenézisből származó *osk* mutánsok petekamráiban. A fiatal petekamrákban az *osk* RNS a petesejtben halmozódik fel, kitöltve annak térfogatát. Mind az öt P elem mutagenézisből származó mutánsban a vad típushoz képest gyengébb *osk* RNS festődést kaptunk, ugyanakkor szembetűnő volt a petesejtek kis mérete a legidősebb petekamrákban (11. ábra).



11. ábra. *osk* RNS *in situ* hibridizáció DIG jelölt próbával. VT= vad típus (*Ore-R*). A mutáns petekamrák homozigóta nőstényekből származnak.

Az *osk*¹⁸⁷ mutáns petefészekbe a DIG *osk* RNS *in situ* hibridizáció egyáltalán nem mutatott jelet. Ezért egy érzékenyebb detektálási eljárást alkalmaztunk, ahol próbaként fluoreszcens festékkel jelölt antiszensz *osk* RNS-t használtunk. Mivel a DIG jelölt *osk* RNS *in situ* hibridizáció és a follikuláris sejtek, valamint a karioszóma vizsgálatok során a P elem mutagenézisből származó mutánsokban nagyon hasonló volt a festődés, a további kísérletben az *osk*¹⁸⁷-et mint a csoport reprezentatív tagját használtuk. Az *in situ* hibridizáció során, melynek eredményét a 12. ábra mutatja.

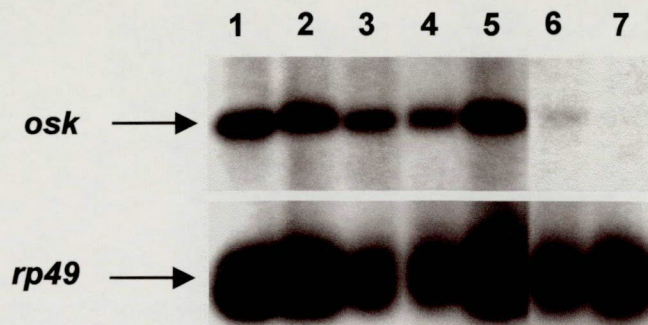


12. ábra. *osk* RNS *in situ* hibridizáció fluoreszcensen jelölt *osk* próbával. VT= vad típus. Az *osk*⁴⁸⁷/*Df* petekezdeményekben nem tudunk *osk* RNS-t kimutatni.

A vad típusban erős hibridizációs jel látható, míg az *osk*¹⁸⁷ esetében gyengébb a festődés. Az *osk*⁴⁸⁷ petekamráiban nem látható hibridizációs jel, ami az *osk* RNS hiányára utal.

3.9.4 Az új *osk* mutánsok vizsgálata Northern blottal:

Az RNS *in situ* hibridizálás az *osk* RNS mennyiségének csökkenését, illetve hiányát mutatta a mutáns vonalakban. Az RNS mennyiségét Northern blottal is ellenőriztük. PolyA mRNS-t izoláltunk *osk*¹⁸⁷/*osk*¹⁸⁷, *osk*¹⁸⁷/*Df p*^{XT103}, *osk*⁵⁴/*Df p*^{XT103} genotípusú mutáns nőstényekből és a vad típusú *Ore-R* törzsből. Az *osk*⁵⁴/*Df p*^{XT103} és *Ore-R* törzsek olyan fiatal nőstényeiből izoláltuk az RNS-t, amelyekben nem voltak 8. stádiumnál idősebb petekamrák. Próbaként az *osk* gén P³² radioizotóppal jelölt kódoló szakaszát használtuk. A Northern blot eredményét a 13. ábra mutatja.



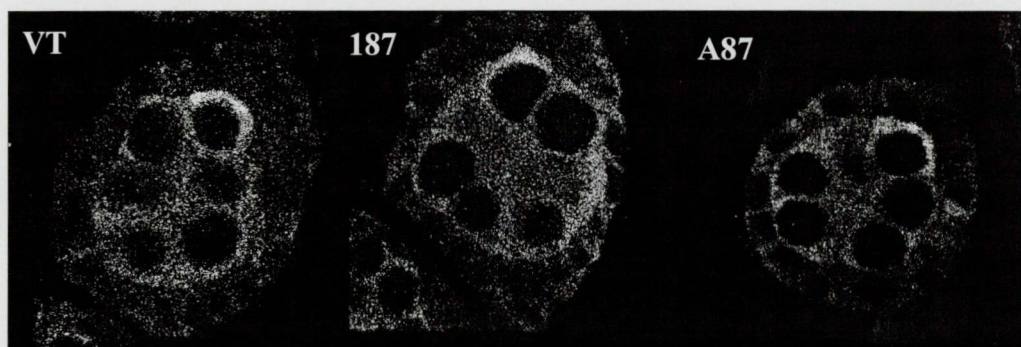
13. ábra. *osk* Northern blot. 1= a minta 1-14. stádiumos *Ore-R* petekamrákból származik, 2= a minta 1-7. stádiumos *Ore-R* petekamrákból származik, 3= *egl^{RC12}*, 4=*orb^{mel}*, 5= *osk⁵⁴/Df*, 6=187/187, 7=187/Df, rp49= kontroll

A Northern analízissal az *osk⁵⁴* mutánsban a vad típussal megegyező mennyiségű *osk* RNS-t detektáltunk. Kontrollként az *egl^{RC12}* és *orb^{mel}* mutánsokból származó mintákat használtuk, melyek az *osk¹⁸⁷*-hez nagyon hasonló, alulfejlett petefészkeket hoznak létre. Mind az *egl^{RC12}*, mind az *orb^{mel}* mutánsokban jól kimutatható az *osk* RNS. Az *osk¹⁸⁷* homozigóta mutánsban az *osk* RNS mennyisége jelentősen lecsökkent, míg a hemizigóta *osk¹⁸⁷*-ben nem tudtunk RNS-t kimutatni.

Az *in situ* hibridizációs kísérletek és a Northern blot eredménye alapján kijelenthetjük, hogy az *osk¹⁸⁷*-ben az *osk* mRNS mennyisége erősen lecsökkent, ezért *osk* RNS hipomorf-nak hívjuk a dolgozatban. Az érzékeny fluoreszcens kimutatási módszerrel sem sikerült az *osk⁴⁸⁷* mutánsban az *osk* RNS jelenlétét kimutatni, sőt egy később elvégzett RT-PCR kísérletben sem tudtunk *osk* RNS-t kimutatni az *osk⁴⁸/Df* mintában (21. ábra, 3-as minta). Így az *osk⁴⁸⁷* egy *osk* RNS null mutáns.

3.10 Az új *osk* mutánsokban a petesejt kialakul:

A *BicD* fehérje már az 1. stádiumos petekamrák petesejtjében akkumulálódik és a korai petesejt differenciálódás kiváló markeréül szolgál. Megvizsgáltuk az *osk*¹⁸⁷ és *osk*^{A87} mutánsokban a *BicD* fehérje expresszióját és lokalizációját. A *BicD* fehérje antitest festés eredményét a 14. ábra mutatja. Mind az *osk*^{A87}, mind az *osk*¹⁸⁷ mutáns petekamra petesejtjében kimutatható a *BicD* fehérje felhalmozódása, ami azt jelenti, hogy a petesejt kialakul, így a szintén korán lokalizált *osk* RNS hiánya az *osk*^{A87} esetében nem magyarázható a petesejt esetleges hiányával.

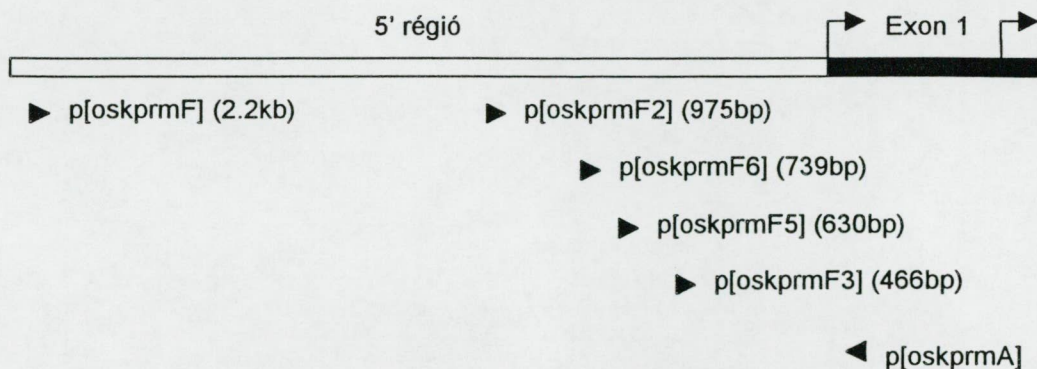


14. ábra. A *BicD* fehérje kimutatása fiatal petekamrákon. VT= vad típus (*Ore-R*). Mind a *187/Df* és *A87/Df* mutánsokban a *BicD* fehérje a petesejtben halmozódik fel.

3.11 Az új *osk* mutánsok molekuláris jellemzése:

3.11.1 Az *osk* RNS hipomorf mutánsok molekuláris jellemzése:

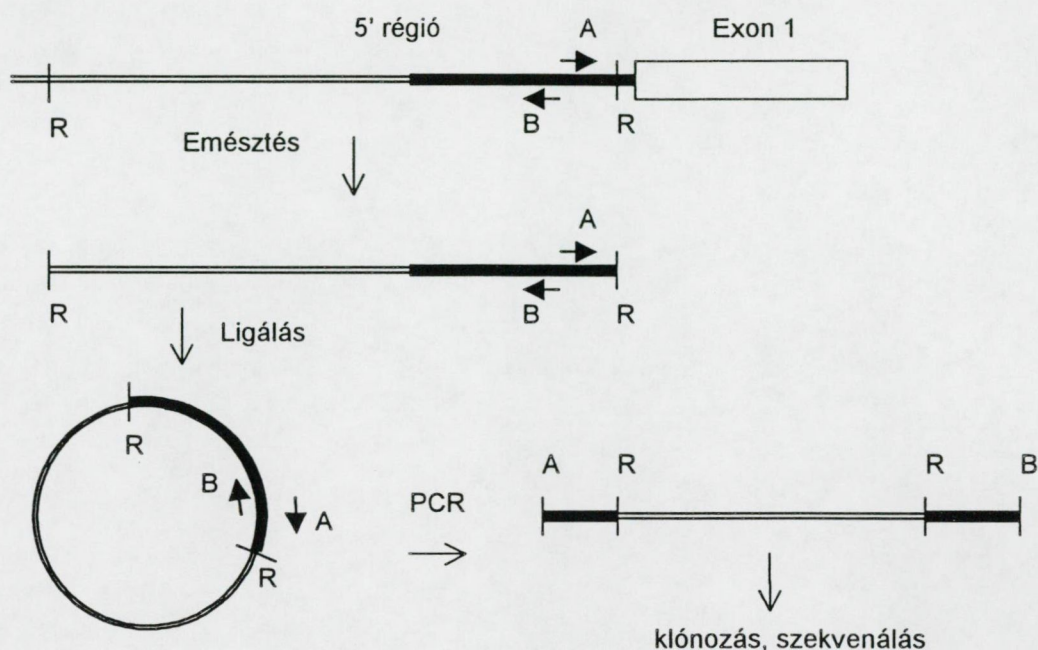
A Northern és RNS *in situ* hibridizációs kísérletekből megtudtuk, hogy az *osk*¹⁸⁷ mutánsban a vad típushoz képest kevesebb *osk* mRNS mutatható ki. A csökkenés egyik lehetséges oka a promóter régiót érintő valamilyen változás. Az *osk* gén genomikus 5' túlnyúló szakasz szekvenciája 2 kilobázis hosszan ismert. Primereket tervezünk, hogy PCR-t alkalmazva kimutassuk a 2 kilobázisos részben bekövetkezett esetleges átrendeződést (15. ábra).



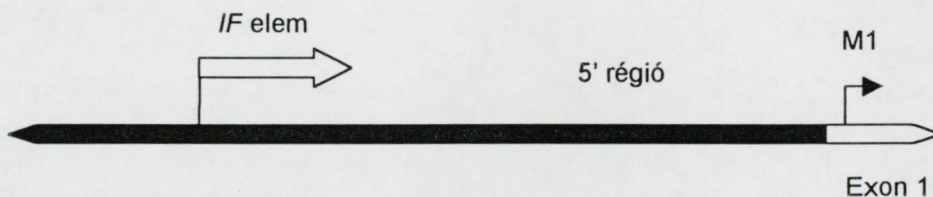
15. ábra. Primerek az *osk* gén 5' régiójának analizéséhez. A nyílhegyek a primerek irányultságát jelölik. A zárójelekben lévő értékek az F-A felamplifikált szakaszok méretét jelölik.

Az összes *osk* RNS hipomorf mutánsban egyedül a p[oskprmF3], p[oskprmA] primer párral kaptunk PCR terméket. Ez arra utal, hogy a transzlációs iniciációs helytől 5' irányban, a 466 bázispár hosszú szakaszon túl genetikai átrendeződés (delécio vagy inszercio) történt.

Inverz PCR technikával kerestük meg az átrendeződés helyét. Megfelelő restrikciós enzimet és primereket választva olyan DNS szakaszt tudtunk megsokszorozni, amelynek egyik része az *osk* promóter régiót, másik része az idegen DNS-t tartalmazta (16. ábra). A már ismert szekvenciájú 5' szakaszból elindulva sikerült az ismeretlen DNS egy darabjának szekvenciáját meghatározni. A kapott szekvenciával homológia keresést végeztünk és kiderült, hogy az, a muslicában *I faktorként* (*IF*) ismert mozgékony genetikai elem szekvenciájával egyezik meg. Tehát a hipomorf *osk*¹⁸⁷ mutánsban az *osk* gén 5' régiójába, 534 bázisparra a transzkripció iniciációs helytől egy *IF* mozgékony genetikai elem inszertálódott (17. ábra). Az *osk*¹⁸⁷ mutánsához hasonló módon az *osk*¹⁸⁸ és *osk*⁴⁴⁸ mutánsokban is sikerült kimutatni az *IF* elemet az 5' régióban.



16. ábra. Az inverz PCR lépései az *osk*¹⁸⁷ mutáció helyének meghatározására. Jelölések: R= restrikciós enzim (Ssp I). A és B= primerek az ismert promóter régió DNS-ének két szálára. A primerek klónozáshoz alkalmas restrikciós enzim hasító helyet tartalmaztak. A kettős vonal az ismeretlen DNS szakaszt, míg a megvastagított vonal a már ismert DNS szekvenciát jelöli.

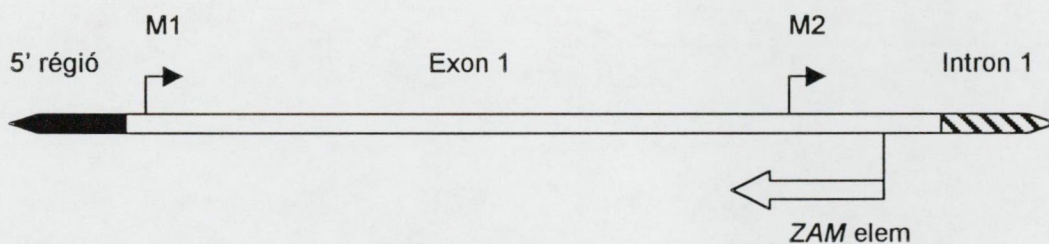


17. ábra. Az IF elem helyzete az *osk*¹⁸⁷ mutáns *osk* génjének 5' régiójában. Az IF elem a transzkripció iniciációs helytől 5' irányban 534 bázispárra épült be, az *osk* transzkripcióval azonos irányultsággal. Az M1 az első transzláció iniciációs helyet jelöli.

Az P elem mutagenézis során izolált öt *osk* mutáns minden vizsgálatban azonos módon viselkedett. A molekuláris analízis pedig bebizonyította, hogy ugyanaz a mutációs esemény történt a mutáns vonalakban, azaz az öt új *osk* mutáns egymással azonos és valószínűleg egyetlen premeiotikus eseményből származó csoportot alkot.

3.11.2 Az *osk* RNS hiányos *osk*^{A87} mutáns molekuláris jellemzése:

Az *osk*^{A87} mutánsban az *osk* gén 2 kilobázisos 5' régiója nem mutat eltérést a vad típushoz képest. A kódoló régió Southern analízise kimutatta, hogy az első exon méretében történt változás. Az első exonban található BssHII restrikciós enzim felismerő helyébe, melynek szekvenciája 5'- GCGCGC -3', egy *ZAM* retrotranszpozon inszertálódott (GCGCG *ZAM* inszerció C, 18. ábra).



18. ábra. A *ZAM* retrotranszpozon helyzete az *osk*^{A87} mutáns első exonjában. Az M1 és M2 a két transzlációs iniciációs helyet jelölik. A *ZAM* elem az 1-es exon végétől 51 bázispárra épült be, az *osk* transzkripcióval ellentétes irányultsággal.

3.12 A petét nem rakó fenotípus menekítése *osk* tarszgénekkal és *osk* fehérje hiányos mutánsokkal:

A részletes komplementációs analízis során az *osk* fehérje null allélek (*osk*^{S4}, *osk*^{S4}) komplementálták az új *osk* mutánsok petét nem rakó fenotípusát, míg az *osk* delécio nem komplementálta azt. Felmerül a lehetősége annak, hogy a fehérje null allélek esetében az *osk* RNS menekít. Hogy ezt a feltételezést bebizonyítsuk, külön-

böző *osk* genomikus darabokat tartalmazó transzgénekkel és *osk* fehérje null allélekkel próbáltuk az új *osk* fenotípust menekíteni. Négy napon keresztül nyomon követtük, hogy az egyes transzgén-mutáns kombinációk genotípusait hordozó egyedi nőstények raktak-e petéket vagy sem. A kísérletekben vad típusú kontrollként az *Ore-R* törzset használtuk. A keresztezéseket úgy terveztük, hogy egyazon keresztezésből származzon a tesztelni kívánt transzgént a mutáns háttéren hordozó egyed és a transzgén nélküli mutáns egyed, mint belső negatív kontrol.

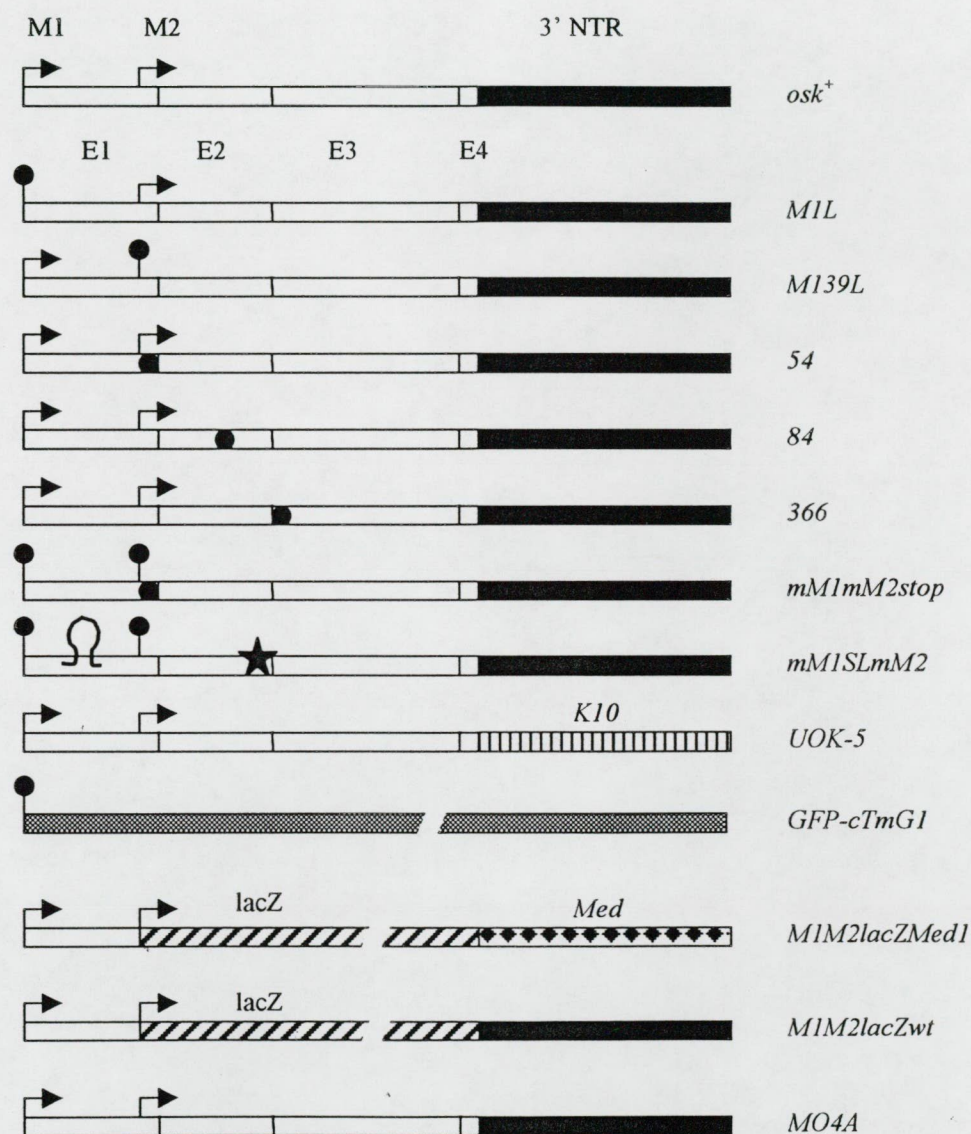
A transzgének nélküli *osk*^{A87}/*Df* *p*^{XT103} és *osk*^{I87}/*Df* *p*^{XT103} nőstények, mint negatív kontrollok, egyetlen esetben sem raktak petét. A transzgéneket a két mutáns háttéren nem egyetlen kísérletben teszteltük, hanem különböző időpontokban elvégzett kísérletekben. Az adatok összehasonlíthatósága érdekében a négy napos peterakás átlagolt értékeit az adott kísérlet vad típusú *Ore-R* értékére normalizáltuk, átlagoltuk és szórást számoltunk.

A menekítési kísérletekben használt transzgének a pGEM-11Zf(+) vektorba (Promega Corporation) klónozott 6,4 kilobázis méretű, genomikus XhoI-ApaI fragment különböző származékai. Az XhoI-ApaI genomikus fragment tartalmazza az *osk* gén 5' régiójának 2 kilobázis hosszú darabját, a gén kódoló szakaszát intronokkal, a gén 3' nem kódoló szakaszát és 900 bp hosszú genomikus szekvenciát a 3' nem kódoló szakaszon túl.

3.12.1 A petét nem rakó fenotípust az *osk* mRNS menekíti:

Először két már ismert transzgénnel teszteltük a mutánsokat. Az *osk*^{MIL} transzgén az *osk* gén első transzlációs iniciációs helyén hordoz egy mutációt (19. ábra) és így az oskar fehérjének csak a rövid izoformáját képes termelni. Ez a rövid izoforma képes teljesen menekíteni az oskar fehérje null *osk*^{S4} és *osk*^{B4} mutánsok

abdomen hiányos és ivarsejt hiányos fenotípusát. Az *oskM139L* transzgén az oskar fehérje hosszú izoformáját termeli, mivel a második transzlációs iniciációs helyén hordoz egy mutációt (19. ábra). A hosszú izoforma nem képes menekíteni az *osk*⁵⁴ és *osk*⁸⁴ mutánsok abdomen hiányos és ivarsejt hiányos fenotípusát. Mind az *MIL* és *M139L* transzgének komplementálták az *osk*⁴⁸⁷ és *osk*¹⁸⁷ petét nem rakó fenotípusát (5. és 6. táblázat, 20. ábra.).



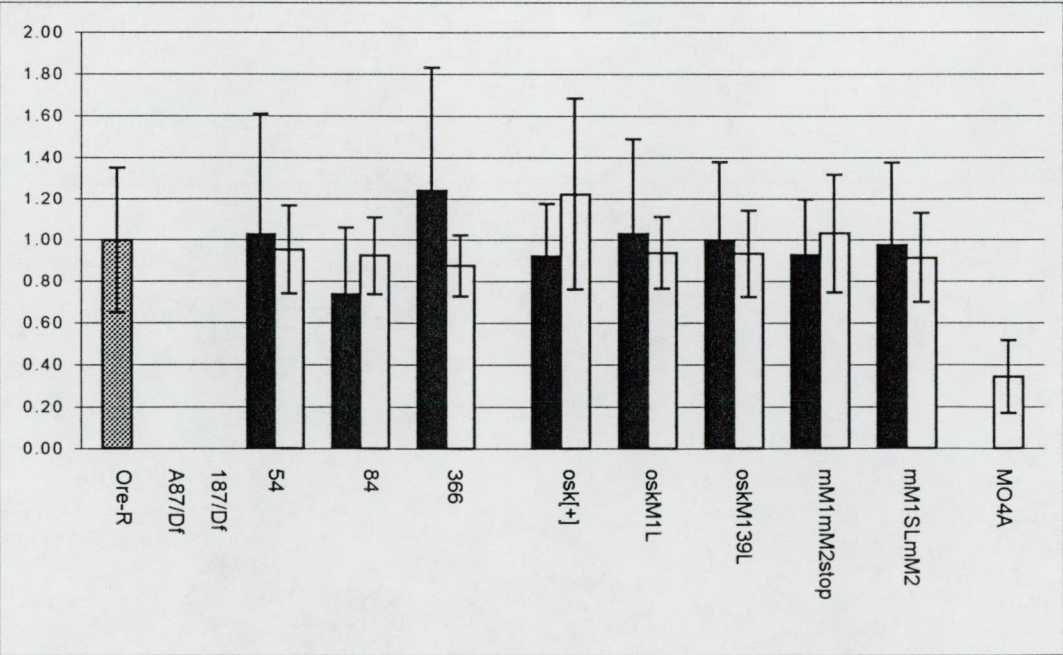
19. ábra. A tesztelt transzgének és az *osk* allélek transzkriptjeinek sematikus ábrázolása. E1-E4 az exonokat jelöli. NTR= nem transzlálódó régió. M1 és M2 a transzlációs iniciációs helyeket jelölik. Fekete kitöltött körrel jelöltük a stop kodont (*54*, *84*, *366*) és a mutációt hordozó M1-et és M2-t. Fekete csillaggal jelöltük a leolvasási keret eltolódást okozó mutáció helyét. Fekete téglalap jelöli az *osk* 3'NTR régiót. A ferde sátozású téglalap a lacZ gén kódoló szakaszát jelöli. A függőlegesen vonalkázott téglalap a *K10* gén 3'NTR-ét jelöli. A szürke téglalap a *GFP* és *cTm* gének kódoló szakaszát jelölik. A kis fekete négyszögekkel kitöltött téglalap a *Medfly osk* homológjának 3'NTR-ét jelöli.

	Vizsgált nőstények száma	pete/nőstény/nap átlag	Vad típusra normált átlag	Szórás
<i>Ore-R</i>	33	9.39	1.00	0.29
<i>P(w⁺ osk⁺)/+;</i> <i>A87/Df</i>	32	8.66	0.92	0.25
<i>oskM1L/+; A87/Df</i>	35	9.67	1.03	0.46
<i>oskM139L/+;</i> <i>A87/Df</i>	33	9.39	1.00	0.38
<i>mM1SLmM2(a)/+;</i> <i>A87/Df</i>	34	10.05	1.07	0.49
<i>mM1SLmM2(b)/+;</i> <i>A87/Df</i>	34	9.13	0.97	0.41
<i>M1M2lacZwt4.1/+;</i> <i>A87/Df</i>	36	0.00	-	-
<i>M1M2lacZMed1/+;</i> <i>A87/Df</i>	34	0.00	-	-
<i>GFP-cTmG1/+;</i> <i>A87/Df</i>	35	0.00	-	-
<i>SM6b/+; A87/Df</i>	37	0.00	-	-
<i>ORE-R</i>	30	5.89	1.00	0.37
<i>SM6b/+; .../TM3</i>	31	7.77	1.32	0.38
<i>54/A87</i>	30	6.06	1.03	0.58
<i>84/A87</i>	32	4.34	0.73	0.32
<i>346/A87</i>	32	7.32	1.24	0.59
<i>SM6b/+; A87/Df</i>	33	0.00	-	-
<i>ORE-R</i>	35	10.74	1.00	0.30
<i>mM1mM2stop/+;</i> <i>A87/Df</i>	38	8.90	0.93	0.27
<i>MO4A/+; A87/Df</i>	40	0.00	-	-
<i>UOK-5/NGT40;</i> <i>A87/Df</i>	38	0.00	-	-
<i>UOK-5/+; A87-</i> <i>Gal4VP16/Df</i>	40	0.00	-	-

5. Táblázat. Az *osk^{A87}* mutáns petét nem rakó fenotípusának menekítése különböző *osk* transzgénekkel és allélekkel. Kontrollként az *Ore-R* törzset használtuk.

	Vizsgált nőstények száma	pete/nőstény/nap átlag	Vad típusra normált átlag	Szórás
<i>ORE-R</i>	33	9.42	1.00	0.40
<i>P(w⁺ osk⁺)/+;</i> <i>187/Df</i>	35	11.51	1.22	0.46
<i>oskM1L/+; 187/Df</i>	35	8.83	0.94	0.17
<i>oskM139L/+;</i> <i>187/Df</i>	35	8.79	0.93	0.21
<i>mM1SLmM2(a)/+;</i> <i>187/Df</i>	34	8.05	0.85	0.25
<i>mM1SLmM2(b)/+;</i> <i>187/Df</i>	35	8.61	0.91	0.21
<i>54/187</i>	33	8.96	0.95	0.21
<i>84/187</i>	31	8.69	0.92	0.19
<i>346/187</i>	37	8.22	0.87	0.15
<i>M1M2lacZwt4.1/+;</i> <i>187/Df</i>	38	0.00	-	-
<i>M1M2lacZMed1/+;</i> <i>187/Df</i>	34	0.00	-	-
<i>GFP-cTmG1/+;</i> <i>187/Df</i>	35	0.00	-	-
<i>SM6b/+; 187/Df</i>	36	0.00	-	-
<i>ORE-R</i>	35	10.74	1.00	0.30
<i>mM1mM2stop)/+;</i> <i>187/Df</i>	36	10.77	1.03	0.29
<i>MO4A/+; 187/Df</i>	31	3.69	0.34	0.18
<i>UOK-5/NGT40;</i> <i>187/Df</i>	36	0.00	-	-

6. Táblázat. Az *osk*¹⁸⁷ mutáns petét nem rakó fenotípusának menekítése különböző *osk* transzgénekkel és allélekkel. Kontrollként az *Ore-R* törzset használtuk.



20. ábra. A vad típusra normált (*Ore-R*=1) peterakási adatok, szórás feltüntetésével. A fekete oszlopok az *osk*¹⁸⁷, a fehér oszlopok az *osk*¹⁸⁷ mutáns háttéren mért adatokat jelenítik meg.

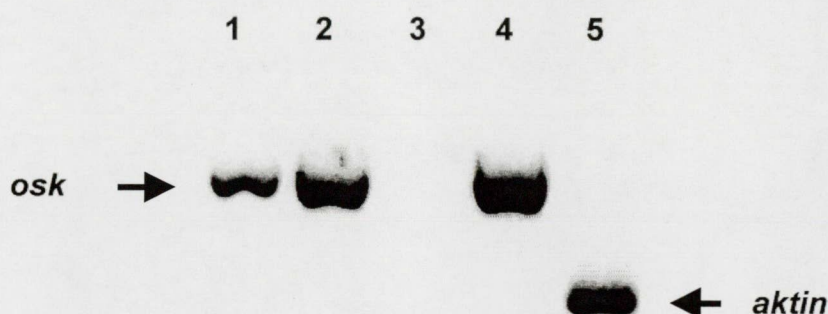
Az *osk*⁵⁴ mutánsban egy stop kodon található az első exonban, az *osk*⁸⁴ mutánsnál a második exonban és az *osk*³⁴⁶ mutánsnál a harmadik exonban (19. ábra). Ezekben a mutánsokban nem mutatható ki oskar fehérje sem Western blottal, sem *in situ* antitest festéssel. Mind a három erős *osk* allél komplementálta az *osk*⁴⁸⁷ és *osk*¹⁸⁷ petét nem rakó fenotípusát (5. és 6. táblázat, 20. ábra.).

Elvégeztük a menekítési kísérletet két *in vitro* készített *osk* fehérje null transzgénnel is. Az *mM1mM2stop* transzgén esetében 3 mutáció segítségével úgy változtattuk meg az *osk* gént, hogy az M1 és M2 transzlációs iniciációs kodonokat AUG-ről CGC-re és GGT-re változtattuk és az első exon végére egy stop kodont raktunk (19. ábra), hogy mindezzel megakadályoztuk a transzlációt. Az *mMISLmM2* transzgén esetében ugyancsak elrontottuk M1-et és M2-t és egy kihurkolódást előidéző DNS szakaszt (stem loop) építettünk M1 és M2 közé, valamint a második exonba egy leolvadási keret eltolódást okozó (frame shift) mutációt raktunk (19. ábra) azért, hogy megakadályozzuk a transzlációt. Az *mM1mM2stop* és *mMISLmM2* *osk* fehérje null transzgének tökéletesen komplementálták az *osk*⁴⁸⁷ és *osk*¹⁸⁷ petét nem rakó fenotípusát (5. és 6. táblázat, 20. ábra.).

A fehérje null mutánsok és az *in vitro* készített fehérje null transzgének fehérjét nem, de teljes hosszúságú *osk* mRNS-t termelnek. Azaz az *osk* mRNS és nem a fehérje képes az új mutánsok fenotípusát menekíteni.

A fentebb fehérje nullként emlegetett mutánsok (*osk*⁵⁴, *osk*⁸⁴, *osk*³⁴⁶) esetében nem lehet kizárni csönkolt, rövid életű, OSK termékek létét. Azért, hogy kizárjuk az oskar fehérje esetleges szerepét az új mutánsok menekítésében, olyan transzgénre volt szükségünk, ami vad oskar fehérjét termel, ugyanakkor *osk* RNS mutáns. E különleges feltételnek tesz eleget az *UOK-5* transzgén, mely az élesztőből származó UAS aktivátor mögött tartalmazza az *osk* gén kódoló részét és az *osk* 3'NTR-e helyett egy

idegen gén, a *K10* 3'NTR-ét (19. ábra). A transzgén az UAS aktivátoron keresztül Gal4 fehérjével indukálható (Brand and Perrimon, 1993; Fischer et al., 1988) és ennek eredményeként funkcionális oskar fehérje termelődik (Ephrussi személyes közlés). Gal4 forrásként az *NGT40*-et és a *nosGal4VP16*-ot használtuk a kísérletekben (Tracey et al., 2000; Van Doren et al., 1998). Az *NGT40* az 1. stádiumos petekamrától az 5. stádiumos petekamráig fejeződik ki, míg a *nosGal4VP16* az összes petekamra stádiumban az *NGT40*-nél erősebben fejeződik ki. A Gal4 aktivált *UOK-5* transzgén nem komplementálta az *osk*^{A87} és *osk*^{I87} petét nem rakó fenotípusát (5. és 6. táblázat, 20. ábra.). RT PCR-rel ellenőriztük, hogy az *UOK-5* transzgenről átíródik-e az *osk* mRNS az *osk*^{A87}/*Df* genetikai háttéren (21. ábra.).



21. ábra. RT PCR kísérlet az *UOK-5* transzgén által termelt *osk* mRNS kimutatására. 1= *UOK-5/NGT40; oskA87/Df*, 2= *UOK-5/+; Gal4VP16-A87/Df*, 3= *SM6b/+; Gal4VP16-A87/Df* (RNS null), 4= *Ore-R* (vad típus), 5= 2-es minta aktin primerekkel (kontroll). Az *osk* primerekkel egy 418 bp-os szakasz, míg az aktin primerekkel egy 220 bp-os szakasz amplifikálható fel. Ez a kísérlet is szemléletesen bizonyítja, hogy az *osk*^{A87}/*Df* mutánsban nem termelődik *osk* RNS (3-as minta).

Tudjuk, hogy az *UOK-5* transzgén vad, funkcionális oskar fehérjét termel (Ephrussi személyes közlés), ugyanakkor mutáns *osk* RNS-t, mivel a kódoló régiót a *K-10* gén NTR-e követi és nem az *osk* NTR-e. Ebből az következik, hogy az oskar fehérje önmaga nem képes menekíteni az új mutánsokat.

3.12.2 Az *osk* transzkript menekítő képessége nem modulus:

Annak érdekében, hogy tisztázzuk van-e az *osk* RNS-nek egy kitüntetett szerkezeti eleme, amely felelős a menekítésért, olyan kísérletet végeztünk, melyben az *osk* mRNS különböző darabjait tartalmazó transzgénekkel próbáltuk menekíteni az új mutánsokat.

A *GFP-cTmG1* transzgén az *osk* génnek csak 30 bázispár hosszú szakaszát tartalmazza (15 bp 5'NTR és 15 bp kódoló szakasz), míg az *MIM2lacZMed1* transzgén az *osk* gén 5'NTR-ét és az M1 és M2 közötti szakaszát hordozza (19. ábra.). Sem a *GFP-cTmG1*, sem az *MIM2lacZMed1* transzgén nem komplementálta az *osk*^{A87} és *osk*^{I87} petét nem rakó fenotípusát (5. és 6. táblázat, 20. ábra.). Az *MIM2lacZwt* transzgén, mely hasonló az *MIM2lacZMed1* transzgénhez, az *osk* gén 5'NTR-ét, az M1 és M2 közötti szakaszát és a teljes 3'NTR-ét tartalmazza (19. ábra.). Azonban a *MIM2-lacZwt* transzgén sem komplementálta az *osk*^{A87} és *osk*^{I87} petét nem rakó fenotípusát (5. és 6. táblázat, 20. ábra.). Ezekből az adatokból arra következtetünk, hogy a menekítéshez sem az 5'NTR, sem a kódoló szakasz, sem a 3'NTR egyedül nem elegendő, csak a teljes hosszúságú RNS képes menekíteni.

Mivel a felhasznált transzgének genomikus szekvenciákat tartalmaznak, kíváncsiak voltunk, hogy az intronoknak van-e valamilyen szerepük a menekítésben. Az *MO4A* transzgén az *osk* gén cDNS-ét tartalmazza (19. ábra.). Egy kópia *osk* cDNS menekíti az *osk*^{I87} petét nem rakó fenotípusát (6. táblázat, 20. ábra.). Ezzel szemben az *osk*^{A87} petét nem rakó fenotípusát egy kópia *osk* cDNS nem, két kópia azonban menekíti (5. táblázat, 20. ábra.). A cDNS-sel történő menekítési kísérlet eredménye azt mutatja, hogy az új *osk* mutánsok menekítéséért nem az intron szakaszok felelősek, hanem az érett RNS rendelkezik a menekítéshez szükséges funkcióval.

4. Eredmények összefoglalása:

- Nagyléptékű P elem indukált mutagenézis kísérletben több ezer vonalat állítottunk elő. Ezekből létrehoztunk egy letális gyűjteményt, egy steril gyűjteményt és az unokátlan mutánsok csoportját.
- A steril vonalak szűrésével a *stau*, a *vas*, a *ftz-F1* és az *osk* gének új mutáns alléljeit azonosítottuk. Részletesen a *vas*, *ftz-F1* és az új *osk* mutánsokat vizsgáltuk.
- Részletes komplementációs analízissel és *osk* transzgénnel történő menekítéssel bizonyítottuk, hogy az újonnan izolált mutánsok valóban az *osk* gén alléljai.
- Az oogenezis korai szakaszát érintő új *osk* fenotípust részletesen leírtuk.
- Kimutattuk, hogy az új mutánsokban az *osk* RNS mennyisége erősen lecsökkent (*osk* RNS hipomorfok), illetve hiányzik (*osk* RNS null).
- Meghatároztuk az új *osk* mutánsok molekuláris természetét. A P elem mutagenézisből származó mutánsok esetében egy *I faktornak* nevezett transzpozon inszertálódott az *osk* gén 5' régiójába. Az *osk*^{A87} mutánsban egy *ZAM* retrotranszpozon inszertálódott az *osk* gén első exonjába.
- *osk* mRNS-sel sikeresen menekítettük az új *osk* mutánsok petét nem rakó fenotípusát.
- Kimutattuk, hogy az oskar fehérje önmaga nem képes menekíteni az új mutánsokat.
- Igazoltuk, hogy a mutánsok menekítéséhez a teljes hosszúságú *osk* RNS szükséges.
- Megmutattuk, hogy az érett *osk* mRNS felelős a menekítésért.

5. Eredmények megbeszélése:

Laboratóriumunk az ivarsejt meghatározásban szerepet játszó gének tanulmányozásával foglalkozik. Az ivarsejt képzés eddig ismert molekuláris mechanizmusai arra utalnak, hogy a különböző RNS-ek lokalizációjának döntő szerepe van, a poláris plazma és az ivarsejtek kialakításában. A mRNS-ek a transzláció mintáiként szolgálnak, lokalizációjuk lehetővé teszi, hogy a fehérjék azokban a szubcelluláris régiókban íródjanak át, ahol azokra szükség van. Úgy tűnik, a lokalizált fehérjeszintézis nagyon hatékony módja a fehérjék pontos célbajuttatásának. A *muslica* petesejtjében a mRNS-ek lokalizációja fontos szerepet játszik a polarizáció kialakításában, így a *grk*, az *osk*, a *bicoid* (*bcd*) és a *nos* mRNS-ek lokalizációja alapvető a petesejt és a későbbi embrió polaritásának kialakításában (Berleth et al., 1988; Ephrussi et al., 1991; Gavis and Lehmann, 1992; Gonzalez-Reyes et al., 1995; Kim-Ha et al., 1991; Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993).

A *muslica* oogenezisének speciálítása, hogy az oogenezis egyes lépései egy petefészken belül egyszerre láthatók, oly módon, hogy a germáriumot elhagyó petekamrák lineárisan sorbarendezve reprezentálják a különböző fejlődési állapotokat. Így az egyes stádiumokat egyszerre tudjuk tanulmányozni. Továbbá az *osk* RNS transzkripciója és transzlációja térben és időben elválik egymástól. A kísérleti rendszerünk e két sajátossága segített abban, hogy az *oskar* gén két termékéhez, az mRNS-hez és a fehérjéhez, két teljesen különböző biológiai funkciót tudtunk kapcsolni.

Az ivarsejt meghatározásban szerepet játszó új gének azonosítására nagyléptékű P elem indukálta mutagenézis kísérletet végeztünk. Egy ilyen nagy lélegzetű munkánál szinte törvényszerű, hogy az elsődleges célon túl, ami új unokátlan mutánsok izolálása volt (Erdélyi et al., 1995), nagy számú, más érdekes mutánsokat is létrehozunk. Különböző szelekciós szűrőt használva előállítottunk egy letális és egy steril

mutáns gyűjteményt. A letális gyűjtemény más kutatók számára is hozzáférhető volt, akik sikeresen azonosítottak közülük új mutánsokat. Három és fél éven keresztül az én tiszttem volt e letális mutáns gyűjtemény gondozása. A tesztek során találtunk két pair-rule mutánst is, melyekről kiderült, hogy a *ftz-F1* (Guichet et al., 1997) gén két új mutáns allélje. A steril gyűjteményt tesztelve abdomen hiányos embriókat produkáló vonalakat kerestünk, mivel az abdomen hiány a poláris plazma, illetve az *osk* gén elégtelen működésére utalhat. A nyolc abdomen hiányos mutáns jelöltet már ismert abdomen hiányos mutánsokkal komplementáltattuk. Sikerült azonosítanunk egy *stau*, két új *vas* (Tomancak et al., 1998) és öt új *osk* mutánst. Az én feladatom volt, hogy az 5 új *osk* allél részletes genetikai analízisét elvégezzem. Megállapítottuk, hogy az új *osk* mutánsok esetében nem a P elem okozza a mutáns fenotípust. A kormoszómákat a mutációt hordozó 3. kromoszóma kivételével lecseréltük és a további vizsgálatokban ezeket a törzseket használtuk.

Az eddig nem észlelt fenotípus megjelenése és az a tény, hogy nem a P elem felelős a mutációk kialakulásáért, szükségessé tette, hogy részletes komplementációs tesztben vizsgáljuk, vajon a mutánsok valóban *osk* mutánsok-e. A vizsgálatokban felhasználtuk egyik kooperációs partnerünk tőlünk független mutagenézisből izolált *osk*⁴⁸⁷ mutánsát is, aminek *osk* deléció felett mutatott fenotípusa megegyezett az általunk izolált mutánsokéval. A komplementációs kísérlet megerősítette, hogy a P elem mutagenézisből származó mutánsok és az *osk*⁴⁸⁷ sem egymást, sem az *osk*⁵⁴-et és *osk*⁸⁴-et nem komplementálják, tehát tényleg egy új fenotípust mutató *osk* allélokkal van dolgunk. Az új mutánsok homozigóta és egymással transzheterozigóta formában, illetve *osk* deléció felett petét nem rakó fenotípust mutatnak, míg a korábbi *osk*⁵⁴ és *osk*⁸⁴ mutánsok és az új mutánsok transzheterozigóta nőstényei steril, abdomen hiányos utódokat hoznak létre. Az új *osk* mutánsokat sikeresen menkítettük az *osk* vad

kópiáját tartalmazó transzgénnel és ezzel igazoltuk, hogy az új mutánsokban a mutáció valóban az *osk* gént érinti.

A petehiány az *osk* gén egy eddig teljesen ismeretlen fenotípusa. Az új *osk* mutánsokban nincs 7. stádiumnál idősebb petekamra, míg az *osk⁵⁴*-ben érett peték jönnek létre. A mutáció az oogenezis korai, illetve középső szakaszát érinti, leállítva a peteérést. Így az új *osk* mutánsok azt mutatják, hogy *osk* génnek az oogenezisben van egy eddig ismeretlen korai funkciója is. A korábban leírt *osk* mutációk két csoportra oszthatók. Az egyik csoportba tartoznak a nonszensz, az eddig ismert legerősebb fenotípusú mutációk (*osk⁵⁴*, *osk⁸⁴*, *osk³⁴⁶*) (Kim-Ha et al., 1991). A stop kodonoknak megfelelő csonkolt fehérjéket nem sikerült kimutatni ezekben a mutánsokban (Markussen et al., 1995), ami azzal magyarázható, hogy ezek a csonkolt termékek instabilak és szinte azonnal lebomlanak. E mutánsokban az oogenezis a 10. stádiumos petekamráig normális, az *osk* mRNS a vad típusához hasonlóan a petesejt poszterior pólusán lokalizálódik. A 11. stádiumtól kezdve az *osk* mRNS eltűnik a poszterior pólusról, delokalizálódik és később a mutáns embriók poszterior végén sem mutatható ki (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991). Azaz az *osk⁵⁴*, *osk⁸⁴* és *osk³⁴⁶* allélekben a poszterior póluson kihorgonyozott RNS-ek fennmaradásával van probléma. Az OSK hiányában a poláris plazma nem alakul ki, ami abdomen és ivarsejt hiányos embriókhoz vezet. Az *osk* mutációk másik csoportjába a protein nullnál gyengébb, misszensz mutációk tartoznak. Ezeknél az *osk* mRNS lokalizáció normális, azonban a misszensz mutációk megváltoztatják a fehérje szerkezetét ezáltal megakadályozzák az OSK normális működését, nem jön létre a poláris plazma (Kim-Ha et al., 1991). Mind a nonszensz, mind a misszensz mutációk esetében a peteképződés a 11. stádiumig normális.

Az új *osk* mutánsok fenotípusa korábbi és erősebb az eddig ismerteknél, ováriumuk alulfejlettek, peték nem jönnek létre. A petekamrák vizsgálata során számos

rendellenességre derült fény. Az egyik ilyen rendellenesség a petesejtben lévő karioszómát érinti. A mutánsokban a karioszómák fragmentáltak, több darabra esnek szét és ezek a darabok lazán kapcsolódnak egymáshoz. Mivel a petesejt magja az első nyolc stádiumban nem aktív, a karioszóma szétesése nem lehet oka a petekamra degenerációnak.

A másik megfigyelt rendellenesség az új *osk* mutánsokban, a follikuláris sejtek abnormális felhalmozódása. A follikuláris sejtek és a petesejt kommunikációja alapvető fontosságú a muslica embrió anterior-poszterior és dorzális-ventrális tengelyeinek a kialakításában (St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992; van Eeden and St Johnston, 1999). A follikuláris sejtek az 5. stádiumig osztódnak, utána az osztódási program leáll és a későbbi stádiumokban már csak térfogatban növekednek (Mahowald and Kambyzellis, 1980). A szomatikus eredetű follikuláris sejtekben a *Notch*, *Delta*, *discs large (dlg)* és *α -spectrin* génekre van szükség a normális, egy sejt vastag réteg kialakításához (Lee et al., 1997; Ruohola et al., 1991; Xu et al., 1992). A follikuláris sejtek hiperpláziáját a *Notch^{ts}* (Ruohola et al., 1991), az *α -spectrin* (Lee et al., 1997) és a *dlg* (Goode and Perrimon, 1997) mutánsokban írták le. A homozigóta *osk¹⁸⁷* mutánsnál látható follikuláris sejt felhalmozódás, ami a 6. és 7. stádiumos petekamrák elülső és hátsó részén történik, erőteljesebb mint a *Notch^{ts}* és *α -spectrin* mutánsokban és legjobban az egyes *dlg* mutánsokban látott hiperpláziához hasonló. Nem ismert, hogy az *osk* génnek bármilyen szerepe lenne a follikuláris sejtekben. Valószínű, hogy az *osk¹⁸⁷* mutáns esetében az 5. stádiumig számban és méretben normálisnak látszó follikuláris sejtek és a ciszta közötti kommunikációban zavar keletkezik, és a follikuláris sejtek az 5. stádium után még egyszer (vagy kétszer) osztódnak. Azaz a follikuláris sejtek felhalmozódását közvetlenül nem az új *osk* mutáció, hanem a petekamra degenerálódása okozza.

Az *osk* RNS kimutatása jól használható a petesejt markereként, mivel az már a germáriumtól kezdve a petesejtben koncentrálik (Ephrussi et al., 1991). A P elem mutagenézisből származó mutánsok petekamráiban sikerült kimutatni a petesejtekben koncentrálik *osk* mRNS-t, míg az *osk*⁴⁸⁷ esetében nem sikerült *osk* mRNS-t detektálni. A Northern blot, az RNS *in situ* hibridizáció, és az RT-PCR megmutatták, hogy a P elem mutagenézisből származó mutánsok *osk* RNS hipomorfok, míg az *osk*⁴⁸⁷ egy RNS null mutáns. Mivel a fehérje nulloknál erősebb fenotípust figyeltünk meg és az RNS csökkenését, illetve hiányát észleltük, ebből arra következtetünk, hogy az *osk* korai funkciója az *osk* mRNS szintjével hozható kapcsolatba.

Az új *osk* mutánsok molekuláris természete jól magyarázza a megfigyelt csökkent RNS szinteket. A P elem mutagenézisből származó mutánsoknál egy *IF* transzpozon inszertálódott az *osk* gén 5' régiójába. Az *IF* inszerció az *osk* promóterének hatékonyságát csökkentette, ami az *osk* transzkript mennyiségének csökkenését okozza. Az *osk*⁴⁸⁷ mutánsnál egy *ZAM* retrotranszpozon inszertálódott az *osk* első exonjába. A *ZAM* inszerció csaknem 8,6 kilobázisa az *osk*⁴⁸⁷ első exonjában megakadályozza az *osk* génről átiródó RNS-ek érését, sőt valószínűleg maga a transzkripció sem megy végbe. Az RT-PCR eredménye megerősíti ezt a feltevést.

Az a megfigyelés, hogy az új *osk* mutánsokban az *osk* mRNS hiánya megállítja az oogenezist, és hogy az *osk*⁵⁴, *osk*⁸⁴, *osk*³⁴⁶ fehérje null mutánsok komplementálják és menekítik az oogenezist érintő defektust, arra utal, hogy az *osk* mRNS-nek korai, az oskar fehérjétől független funkciója van.

Annak érdekében, hogy eldöntsük azt a kérdést, hogy az *osk* mRNS-nek, illetve az oskar fehérjének milyen szerepe van az új mutánsok petét nem rakó fenotípusának menekítésében, olyan funkcionális tesztek végeztünk, amelyekben különböző transzgének és *osk* alléleket használtunk fel. A kísérletekben olyan körülményeket

hoztunk létre, hogy az oogenezis során az *osk* mRNS különböző darabjai és az oskar fehérje általunk meghatározott módon voltak jelen. Nem meglepő az OSK rövid izoformáját kódoló *oskMIL* transzgén segítségével kapott eredmény, hiszen ez a transzgén más menekítési kísérletekben is a vad értékekhez hasonló értékeket adott (Markussen et al., 1995). Az *oskMIL* menekítési eredményét pozitív kontrollnak tekinthetjük. Az RNS hipotézissel jól magyarázható az OSK hosszú izoformáját kódoló *oskM139L* transzgén menekítő képessége, hiszen a hosszú izoforma a korábbi kísérletekben nem volt képes menekíteni *osk* mutánsokat (Markussen et al., 1995). Az *osk⁵⁴*, *osk⁸⁴* és az *osk³⁴⁶* fehérje null mutánsok (Markussen et al., 1995; Rongo et al., 1995) komplementálják az új mutánsok petét nem rakó fenotípusát. Ezekben az említett menekítési kísérletekben egyedül az *osk* mRNS a közös elem, azaz *osk* mRNS szükséges az új mutánsok menekítéséhez.

A fenti eredmények alapján azonban nem lehet teljesen kizárni, hogy a nélkülözhetetlen *osk* mRNS mellett az oskar fehérjének is van szerepe a menekítésben. Ugyanis az *osk⁵⁴*, *osk⁸⁴* és *osk³⁴⁶* mutánsok esetében csokolt oskar fehérje termékek keletkezhetnek. Valamint a hosszú OSK izoforma funkciójáról csupán annyit tudunk, hogy a petesejt poszterior végén lokalizálódó *osk* mRNS fennmaradását segíti, azonban a fehérje null mutánsokat nem menekíti. Ezért biztosan fehérje null, *in vitro* módosított alléleket kellett készíteni. Az *in vitro* készített *osk* fehérje null transzgének (*mM1mM2stop*, *mM1SLmM2*) esetében kizártuk az *osk* transzkript minden nemű translációjának lehetőségét. Az így előállított biztosan fehérje null transzgének a fehérje null mutánsokhoz hasonlóan menekítették a korai fenotípust.

Hogy még biztosabb bizonyítékot szolgáltatassunk arra, hogy az oskar fehérjének nincs szerepe a korai fenotípus menekítésében egy olyan transzgént készítettünk, amely mutáns *osk* mRNS-t termel és ugyanakkor a mutáns RNS-ről funkcionális

oskar fehérje transzlálódik. Az *UOK-5* transzgént használtuk erre a célra. Az *UOK-5* transzgén funkcionális oskar fehérjét termel (Ephrussi személyes közlés). A transzkript az *osk* mRNS-t tekintve azonban mutáns, mivel az *osk* NTR-e helyett a *K-10* gén NTR-ét tartalmazza. Eredményeink szerint az *UOK-5* transzgén nem menekíti az új mutánsok petét nem rakó fenotípusát. Ez azt jelenti, hogy az oskar fehérje valóban nem menekíti az új mutánsok korai fenotípusát. A fentiek alapján egyértelműen kijelenthetjük, hogy az oskar fehérjére nincs szükség a korai *osk* funkció ellátásához, az *osk* mRNS-nek azonban fontos, eddig ismeretlen szerepe van.

Megvizsgáltuk, hogy az *osk* RNS-nek van-e a menekítésért felelős, kitüntetett szerkezeti eleme. Az *osk* mRNS 5'NTR-ét (*GFP-cTmG1*), az 5'NTR-ét és az M1-M2 szakaszát (*M1M2lacZMed1*), az 5'NTR-ét, az M1-M2 szakaszát és a 3'NTR-ét (*M1M2lacZwt*) hordozó transzgének nem menekítik az új *osk* mutánsokat. Menekítést csak a teljes hosszúságú *osk* RNS-ek (5'NTR, kódoló régió, 3'NTR) esetében tapasztaltunk, azaz a korai *osk* funkcióhoz szükség van a teljes hosszúságú RNS-re.

A fent említett menekítési kísérletekben használt transzgének közül mindegyik, amelyik sikeresen menekített, egy pGEM vektorba klónozott genomi DNS módosított változatai. Az *osk* kódoló szakaszán túl mind 5', mind 3' irányban tartalmaz túlnyúló genomi szakaszokat. Mivel *M1M2lacZwt* konstrukt szintén tartalmazza ezeket a túlnyúló genomi szakaszokat és mégisincs menekítő hatása, kizárhatjuk ezeknek a határoló szekvenciáknak menekítő szerepét.

A cDNS-sel történő menekítési kísérlet eredménye azt is mutatja, hogy az intronok sem szükségesek a korai *osk* funkció ellátásához.

Az új *osk* allélek, az *osk*¹⁸⁷, illetve az *osk*⁴⁸⁷, feltárták, hogy az *osk* kulcsszerepet játszik a korai oogenezisben. Az *osk* korai funkciója rendkívüli abban tekintetben, hogy az *osk* mRNS-en és nem az oskar fehérjén keresztül fejt ki hatását. Az *osk*¹⁸⁷-

ben megfigyelt alacsony, de kimutatható *osk* mRNS mennyisége azt jelzi, hogy létezik az *osk* mRNS-re nézve egy küszöbérték, amely alatt a petekamrák nem képesek tovább fejlődni. Valószínű, hogy az *osk* mRNS és a többi lokalizált RNS-ek olyan RNP komplexként szállítódnak, melyben az RNS-nek szerkezeti funkciója van. A *nos*, a *bcd* és az *osk* esetében a 3'NTR-en az RNS-ek lokalizációjáért felelős szakaszt azonosítottak (Gavis et al., 1996; Kim-Ha et al., 1993; Macdonald et al., 1991; Macdonald and Struhl, 1988). Néhány RNS kötő fehérje, mint pl. a STAU, ORB és BRUNO, a korai oogenezistől kezdve együtt lokalizálódnak az *osk* mRNS-sel, ugyanakkor szerepük van a lokalizációban és/vagy a transláció szabályozásában (Chang et al., 1999; Kim-Ha et al., 1995; St Johnston et al., 1991). A STAU és az *osk* mRNS egymástól kölcsönösen függő módon lokalizálódnak a petesejtben az oogenezis minden stádiumában. Az *osk* RNS null petesejtből emiatt a STAU-t nem lehet kimutatni (St Johnston, D. személyes közlés). Lehetséges, hogy a petesejt fejlődésében esszenciális fehérjék az *osk* mRNS-től, RNP komponensként, mint strukturális partnertől függenek. Az *osk* mRNS egyik lehetséges szerepe a korai oogenezisben, hogy szerkezeti vázként, vagy „állványzatként” vegyen részt az esszenciális fehérjék dajkasejtekből petesejtbe történő juttatásában.

Az RNS-ekről eddig is tudtuk, hogy változatos feladatokat látnak el a sejtben. Nemrég a katalitikus aktivitással rendelkező RNS-ek felfedezése bővítette az addig ismert RNS funkciókat. Újabban a mRNS-ek 3'NTR-ének tanulmányozása szolgált néhány meglepő eredménnyel. Az α -tropomiozin RNS-ének 3'NTR szakaszáról mutatták ki, hogy az RNS aktivált protein kináz (PKR= protein kinase RNA-activated) aktivátora (Rastinejad et al., 1993). Egyes differenciálódás specifikus RNS-ek (troponin I, tropomiozin, α -aktin) 3'NTR szakaszáról kiderült, hogy transz-ható regulátorok, melyek gátolják a sejtosztódást és aktiválják a differenciálódást (Rastinejad

and Blau, 1993). Más mRNS-ek 3'NTR-én a lokalizációért felelős szakaszokat is azonosítottak, mint például a *bcd* (Macdonald, 1990) és az α - és β -aktin (Kislauskis et al., 1993) esetében. Az új *osk* mutánsok arra hívják fel a figyelmet, hogy a mRNS a klasszikus hírvivő RNS funkcióján túl szerkezeti szerepet is betölthet. Különösen a hasonló intracelluláris lokalizációban résztvevő RNS-eknél fordulhat elő, hogy egy fajta vázként működve fehérjékkel kapcsolódnak, melyek a lokalizáció helyén fejtik ki hatásukat. Tudjuk, hogy a *mikrotubulushoz kapcsolt fehérje 2 (MAP2)* és a Ca^{2+} /kalmodulin függő protein kináz II mRNS-ei a posztszinaptikus membrán mentén helyezkednek el az idegsejtekben és ugyanott poliriboszóma koncentrációt is megfigyeltek. Így a muslica oogenezisében résztvevő lokalizált RNS-eken kívül az idegsejtekben lokalizált RNS esetében várható, hogy meg tudjuk figyelni az mRNS funkcióinak olyan kettős szerepét, mint az új *osk* mutánsok esetében. A patkányban megtalált STAU, melyet a *MAP2* cisz-ható elemének (DTE= dendritic targeting element) segítségével azonosítottak (Monshausen et al., 2001) hasonló funkcióra utal. Az emlős STAU a legtöbb szövettípusban, így az agyban is kifejeződik. A dendritekben a STAU a mikrotubulusok mentén koncentrálik. Lehetséges, hogy az idegsejtekben a STAU segítségével RNS-ek kapcsolódnak a dendritek mikrotubulusokból felépülő vázához és ilyen módon szabályozzák szubcelluláris lokalizációjukat.

Summary / Angol nyelvű összefoglaló:

Oskar (osk) mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte, where it is translated. Oskar protein (OSK) organises the posterior pole plasm, recruiting additional factors necessary for abdomen and germline formation in the embryo. Nonsense mutations that prevent production of OSK result in embryos lacking germ cells and abdomen. Here we describe two new *osk* mutants in which *osk* mRNA production is reduced or abolished, causing oogenesis to fail at an early step. This defect is suppressed by *osk* nonsense mutants, as well as by *osk* transgenes whose protein-coding capacities have been anulled. Hence, *osk* mRNA itself plays a crucial role during early oogenesis, possibly acting as a structural element in the assembly of RNP complexes essential for oocyte development.

Two new *osk* mutants, *osk*^{A87} and *osk*^{I87}, were isolated in two independent mutagenesis experiments. Both alleles fail to complement the *osk* protein null alleles, *osk*^{S4}, *osk*^{S4}, and *osk*^{S46}, resulting in the production of embryos that display the classical “posterior group phenotype”, i.e. lack of an abdomen and germline. In contrast, females carrying only an *osk*^{A87} or *osk*^{I87} allele (*osk*^{A87}/*Df* *p*^{XT103}, *osk*^{I87}/*Df* *p*^{XT103}) fail to produce eggs, due to an early arrest of oogenesis. The oocyte is determined and begins to develop in the ovaries of both mutants, as indicated by the accumulation of BicD protein. Defects first become evident at stage 2, when fragmentation of the normally compact karyosome is observed. Mutant egg chambers continue to develop until stage 7, when they begin to degenerate.

Molecular analysis revealed the presence of *IF* and *ZAM* transposable elements in the upstream regulatory sequences and first exon of the *osk*^{I87} and *osk*^{A87} alleles, respectively. The position of these mutagenic elements suggested that they

might affect production or stability of *osk* transcripts. Northern analysis, *in situ* hybridization and RT-PCR of mutant egg chambers confirmed that only residual amounts of *osk* mRNA are present in *osk*¹⁸⁷. The failure to detect any *osk* mRNA in *osk*⁴⁸⁷ showed that it is a true RNA-null allele of *osk*. To definitely prove that the defect in *osk* mRNA expression was the cause of the early oogenesis defects, we performed a rescue experiment using three *osk* transgenes, encoding either both or individual isoforms of OSK. The first, *P(osk*⁺*)*, consists of a genomic DNA fragment that encompasses the *osk* locus and encodes both OSK isoforms. The *P(M1L)* transgene contains a mutation in M1, the first translation initiation site in *osk* mRNA, producing only Short-OSK, the isoform previously shown to mediate pole plasm formation and rescue the protein null mutants. Conversely, the *P(M139L)* transgene produces only Long-OSK, due to a mutation in M2, the second translation initiation site in *osk* mRNA. Although Long-OSK maintains *osk* mRNA at the posterior pole, another function of OSK, it lacks pole plasm-inducing activity and does not rescue the abdominal and germ cell defects of the *osk* protein null mutants, *osk*⁵⁴, *osk*⁸⁴ and *osk*³⁴⁶. All three transgenes fully complemented the egg-less phenotype of *osk*⁴⁸⁷ and *osk*¹⁸⁷, demonstrating that these are indeed *osk* alleles.

The observation that the new *osk* mutants, *osk*⁴⁸⁷ and *osk*¹⁸⁷, lack *osk* mRNA and fail in oogenesis, and that the *osk*⁵⁴, *osk*⁸⁴ and *osk*³⁴⁶ nonsense mutant alleles complement and thus rescue this defect, suggested that the early function of *osk* is mediated by *osk* mRNA, rather than oskar protein. To rule out the possibility that a truncated, unstable and thus undetectable OSK produced by the nonsense alleles was in fact responsible for rescue of the oogenesis defects of *osk*⁴⁸⁷ and *osk*¹⁸⁷, we constructed two translationally incapacitated, protein null *osk* mutant alleles *in vitro*, and tested their rescue capacity. The first construct, *P(mM1mM2stop)*, consisted of an

osk gene identical to the *osk*⁵⁴ nonsense allele, but whose capacity to produce a short peptide initiating from M1 or M2 was abolished by mutation of M1 and M2 to CGC and GGT, respectively. The second construct, *P(mM1SLmM2)*, also containing mutated M1 and M2, was additionally designed to block scanning by small ribosomal subunits, as well as prevent translation of OSK peptides that might initiate from in-frame methionines elsewhere in the *osk* transcript. To this end, a sequence predicted to adopt a stable hairpin structure was inserted between mutated M1 and M2, and a frameshift was introduced downstream of M2. Both *P(mM1mM2stop)* and the *P(mM1SLmM2)* fully complement the egg-less phenotype of *osk*^{A87} and *osk*^{J87}, to the same extent as the original *P(osk⁺)* transgene. These results demonstrate that no feature of oskar protein is involved in early *osk* gene function. Consistent with this, a transgene *P(UAS-OK)* bearing the *osk* coding region flanked by the *K10* 3'UTR, under UASGal4 transcriptional control, that expresses high levels of OSK throughout oogenesis and is a potent inducer of pole plasm, is unable to rescue the early oogenesis defect of *osk*^{J87} and *osk*^{A87}. Hence, *osk* mRNA is the critical component in early oogenesis.

To determine whether the full *osk* transcript is required, or which feature of the mRNA performs the early oogenesis function, we assessed the rescue capacity of the *osk* 5'UTR, coding region, and 3'UTR. The failure of *P(UAS-OK)* to rescue *osk*^{A87} and *osk*^{J87} indicates that the *osk* coding region alone does not provide the early function. Transgenes encoding the *osk* 5'UTR (*P(GFP-cTmG1)*) or the 5' UTR, M1-M2 region and 3'UTR (*P(M1M2lacZwt)*) provided no rescue activity. Taken together, these data show that the 5' and 3' UTRs, as well as the *osk* coding region are all required for early *osk* activity. Therefore, either the entire *osk* mRNA or several distinct elements in different regions of the transcript are required for early *osk*

function. In addition, these results indicate that the genomic DNA flanking sequences, present in all constructs (with the exception of *UAS-OK*), are not responsible for early *osk* function. Similarly, to exclude a role of the *osk* introns in early *osk* function, we tested the ability of an *osk* cDNA (*P(MO4A)*) to rescue the novel *osk* mutants. Both *osk*^{A87} and *osk*^{I87} mutant females containing the *osk* cDNA transgene produced eggs, indicating that the introns are not essential for early *osk* activity, and that it is the processed mRNA product which is the active species.

The new *osk* alleles *osk*^{A87} and *osk*^{I87} reveal that *osk* plays a critical role during early oogenesis. The early function of *osk* is unusual, as it is mediated by *osk* mRNA and not by oskar protein. Furthermore, the low but detectable amount of *osk* mRNA observed in *osk*^{I87} mutants indicates that a threshold exists, below which egg chambers fail to develop. It is likely that localized RNAs such as *osk* mRNA are translocated as ribonucleoprotein (RNP) complexes, first during nucleocytoplasmic transport, then during transport in the cytoplasm. Several RNA-binding proteins, such as STAUFEN (STAU), ORB and BRUNO colocalize with *osk* mRNA from early oogenesis onwards and play a role in its localization and/or translational control. STAU and *osk* mRNA are mutually interdependent for their colocalization in the oocyte during all stages of oogenesis, and consistent with this, STAU is not detected in *osk* RNA null oocytes (data not shown). It is therefore possible that proteins essential for oocyte development depend on *osk* mRNA as a structural partner in the formation of RNPs. A likely role for *osk* mRNA during early oogenesis is that of an RNA scaffold for the transport and localization of such proteins in the oocyte.

Közlemények jegyzéke és idézetek:

A Ph.D. tézishez nem kapcsolódó közlemények:

DEAK,P, ZÁVORSZKY,P, MAROY,P

Moulting hormone regulates its receptor level in *Drosophila melanogaster*.
INSECT BIOCHEM. 18: 847 - (1988).

Impakt: 2.28 Idézet: 47 Független idézet: 46

- 1 Bidmon HJ (1990) INVERTEBRATE REPRODUCTION & DE. 18: 13.
- 2 Koolman J (1990) ZOOLOGICAL SCIENCE. 7: 563.
- 3 Bidmon HJ (1991) CELL TISSUE RES. 263: 183.
- 4 Bidmon HJ (1991) J COMP NEUROL. 310: 337.
- 5 Bidmon HJ (1991) DEVELOP BRAIN RES. 63: 121.
- 6 Bidmon HJ (1991) HISTOCHEMISTRY. 96: 419.
- 7 Brears T(1991) PLANT J. 1: 235.
- 8 Dai JD (1991) INVERTEBR REPROD DEV. 20: 227.
- 9 Deineko YV (1991) DOKL AKAD NAUK SSSR. 319: 1473.
- 10 Hill KK (1991) BIO-TECHNOLOGY. 9: 373.
- 11 Karim FD (1991) GENE DEVELOP. 5: 1067.
- 12 Kludkiewicz B (1991) ACTA BIOCHIM POL. 38: 53.
- 13 Lacorte C (1991) PLANT CELL REP. 10: 354.
- 14 Pezzotti M (1991) PLANT BREED. 106: 39.
- 15 Schroeder HE (1991) AUST J PLANT PHYSIOL. 18: 495.
- 16 Yu JP (1991) SCI CHINA SER B. 34: 932.
- 17 Bidmon HJ (1992) EXPERIENTIA. 48: 42.
- 18 Fahrbach SE (1992) J EXP ZOOL. 261: 245.
- 19 Pichon M (1992) PLANT CELL. 4: 1199.
- 20 Thomas MR (1992) PLANT CELL REP. 11: 113.
- 21 Ueno M (1992) ACTA HISTOCHEM CYTOCHEM. 25: 505.
- 22 Ueno M (1992) HISTOCHEMISTRY. 98: 1.
- 23 Allison LA (1993) PLANT MOL BIOL. 21: 375.
- 24 Baehrecke EH (1993) DEVELOP BIOL. 158: 275.
- 25 Fisk HJ (1993) SCI HORT-AMSTERDAM. 55: 5.
- 26 Grzelak K (1993) INSECT BIOCHEM MOLEC BIOL. 23: 211.
- 27 Kiss GB (1993) MOL GEN GENET. 238: 129.
- 28 Lobler M (1993) PLANT PHYSIOL. 103: 21.
- 29 Quandt HJ (1993) MOL PLANT MICROBE INTERACTION. 6: 699.
- 30 Sobek L (1993) INSECT BIOCHEM MOLEC BIOL. 23: 125.
- 31 Christou P (1994) EUPHYTICA. 74: 165.
- 32 Crespi MD (1994) EMBO J. 13: 5099.
- 33 Csanadi G (1994) PLANT CELL. 6: 201.
- 34 Journet EP (1994) PLANT J. 6: 241.
- 35 Kahl G (1994) EUPHYTICA. 73: 177.
- 36 Khan MRI (1994) PLANT PHYSIOL. 105: 81.
- 37 Pichon M (1994) MOL PLANT MICROBE INTERACTION. 7: 740.
- 38 Segraves WA (1994) RECENT PROG HORMONE RES. 49: 167.
- 39 Stefanov I (1994) PLANT SCI. 95: 175.
- 40 Tanaka T (1994) ARCH INSECT BIOCHEM PHYSIOL. 26: 111.
- 41 Thomas JC (1994) PLANT CELL REP. 14: 31.
- 42 Coronado C (1995) PLANT PHYSIOL. 108: 533.
- 43 Kothapalli R (1995) DEVELOP GENETICS. 17: 319.
- 44 Ninkovic S (1995) PLANT CELL TISSUE ORGAN CULT. 42: 255.
- 45 Sagan M(1995) PLANT SCI. 111: 63.
- 46 Bassett MH (1997) MOL CELL ENDOCRINOL. 131: 39.
- 47 Dinan L (1997) BIOCHEM J. 327: 643.



Identification of ecdysone 20-hydroxy ecdysone and makisterone A in the vetch aphid, *Megoura viciae* Bick.
ACTA PHYTOPATHOL. ENTOMOL. ASH. 29: 161-164 (1994).

1 Polgar LA (1996) COMP BIOCHEM PHYSIOL PT C. 115: 179.

GUICHET,A, COPELAND,J.W.R, ERDÉLYI,M, HLOUSEK,D, ZÁVORSZKY,P, HO,J,
BROWN,S, PERCIVAL-SMITH,A, KRAUSE,H.M, EPHRUSSI,A

Impakt: 29.49 Idézet: 58 Független idézet: 54

- 1 Begemann G (1997) DEVELOPMENT. 124: 4321.
- 2 Biggin MD (1997) DEVELOPMENT. 124: 4425.
- 3 Crawford PA (1997) MOL CELL BIOL. 17: 3997.
- 4 Durocher D (1997) EMBO J. 16: 5687.
- 5 Houzelstein D (1997) MECH DEVELOP. 65: 123.
- 6 Takemaru K (1997) PROC NAT ACAD SCI USA. 94: 7251.
- 7 Amendt BA (1998) J BIOL CHEM. 273: 20066.
- 8 Apergis GA (1998) J BIOL CHEM. 273: 2917.
- 9 Boruk M (1998) MOL ENDOCRINOL. 12: 1749.
- 10 Castelligair J (1998) DEVELOPMENT. 125: 1269.
- 11 Chow L (1998) MECH DEVELOP. 77: 149.
- 12 Dong JL (1998) EMBO J. 17: 2308.
- 13 Fisk GJ (1998) CELL. 93: 543.
- 14 Han W (1998) MOL CELL BIOL. 18: 3384.
- 15 Haqq CM (1998) PHYSIOL REV. 78: 1.
- 16 Ito M (1998) MOL ENDOCRINOL. 12: 290.
- 17 Kim HS (1998) J NEUROSCI. 18: 8247.
- 18 Kim YH (1998) J BIOL CHEM. 273: 25875.
- 19 Lawrence PA (1998) DEVELOP GENETICS. 23: 28.
- 20 Miller AA (1998) EMBO J. 17: 6316.
- 21 Okeefe DD (1998) DEVELOPMENT. 125: 3915.
- 22 Pick L (1998) DEVELOP GENETICS. 23: 1.
- 23 Prefontaine GG (1998) MOL CELL BIOL. 18: 3416.
- 24 Sadovsky Y (1998) J SOC GYNECOL INVESTIGATION. 5: 6.
- 25 Saucedocardenas (1998) PROC NAT ACAD SCI USA. 95: 4013.
- 26 Semina EV (1998) HUM MOL GENET. 7: 415.
- 27 Sepulveda JL (1998) MOL CELL BIOL. 18: 3405.
- 28 Simmonds AJ (1998) GENE DEVELOP. 12: 3815.
- 29 Tang SJ (1998) J BIOL CHEM. 273: 25356.
- 30 Tolkunova EN (1998) MOL CELL BIOL. 18: 2804.
- 31 Tremblay JJ (1998) MOL ENDOCRINOL. 12: 428.
- 32 Viganò MA (1998) MOL CELL BIOL. 18: 6201.
- 33 Yang CY (1998) J NEUROCHEM. 71: 1813.
- 34 Amendt BA (1999) MOL CELL BIOL. 19: 7001.
- 35 Broadus J (1999) MOL CELL. 3: 143.
- 36 Carmi I (1999) GENETICS. 152: 999.
- 37 Carr A (1999) EMBO J. 18: 1598.

- 38 Choi CY(1999) J BIOL CHEM. 274: 31543.
- 39 Dong JL(1999) DEV GENES EVOL. 209: 427.
- 40 Fan Y (1999) DEVELOP BIOL. 210: 481.
- 41 Mannervik M (1999) PROC NAT ACAD SCI USA. 96: 6797.
- 42 Mannervik M (1999) BIOESSAYS. 21: 267.
- 43 Nasiadka A (1999) DEVELOPMENT. 126: 1515.
- 44 Piros ET(1999) J BIOL CHEM. 274: 33677.
- 45 Tremblay JJ (1999) MOL ENDOCRINOL. 13: 1388.
- 46 Tremblay JJ (1999) EMBO J. 18: 3431.
- 47 Yokoyama M (1999) GENOMICS. 59: 40.
- 48 Yu Y (1999) MECH DEVELOP. 83: 95.
- 49 Mann RS (2000) AN. REV. CELL DEV. BIOL. 16 : 243.
- 50 Yamada, M (2000) DEVELOPMENT 127 : 5083.
- 51 Lum, DH (2000) GENES & DEVELOPMENT 14 : 3153.
- 52 Amendt, BA (2000) CELL. AND MOL. LIFE SCIEN. 57 : 1652.
- 53 Asahina, M (2000) GENES TO CELLS 5 : 711.
- 54 Weber, U (2000) DEVELOPMENT 127 : 3619.
- 55 Nasiadka, A (2000) DEVELOPMENT 127 : 2965.
- 56 Pazman, C (2000) DEVELOPMENT 127 : 1715.
- 57 Gissendanner, CR (2000) DEVELOPMENTAL BIOLOGY 221 : 259.
- 58 Cazorla, P (2000) JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 74 : 1829.

TOMANCAK,P, GUICHET,A, ZÁVORSZKY,P, EPHRUSSI,A

Oocyte Polarity Depends on Regulation of Gurken by Vasa.
DEVELOPMENT. 125: 1723-1732 (1998).

Impakt: 10.08 Idézet: 33 Független idézet: 32

- 1 Ghabrial A (1998) GENE DEVELOP. 12: 2711.
- 2 Gonzalezreyes A (1998) DEVELOPMENT. 125: 3635.
- 3 Gunkel N (1998) GENE DEVELOP. 12: 1652.
- 4 Hazelrigg T (1998) CELL. 95: 451.
- 5 Saffman EE (1998) MOL CELL BIOL. 18: 4855.
- 6 Ghabrial A (1999) NAT CELL BIOL. 1: 354.
- 7 Gonzalezreyes A (1999) NAT CELL BIOL. 1: E150.
- 8 Lasko P (1999) FASEB J. 13: 421.
- 9 Lie YS (1999) DEVELOPMENT. 126: 1129.
- 10 Saffman EE (1999) CELL MOL LIFE SCI. 55: 1141.
- 11 Saunders C (1999) MOL CELL. 3: 43.
- 12 Shibata N (1999) DEVELOP BIOL. 206: 73.
- 13 Suzanne M (1999) GENE DEVELOP. 13: 1464.
- 14 Vaneeden F (1999) CURR OPIN GENET DEVELOP. 9: 396.
- 26 Nilson, LA (1999) CUR. TOP.IN DEVEL. BIOL. 44 : 203.
- 15 Mann, RS (2000) ANN. REV. CELL DEV. BIOL. 16 : 243.
- 16 Yamada, M (2000) DEVELOPMENT 127 : 5083.
- 17 Lum, DH (2000) GENES & DEVELOPMENT 14 : 3153.
- 18 Van Buskirk, C (2000) DEVELOPMENT 127 : 4753.
- 19 Amendt, BA (2000) CELL. AND MOL. LIFE SCIEN. 57 : 1652.
- 20 Asahina, M (2000) GENES TO CELLS 5 : 711.
- 21 Weber, U (2000) DEVELOPMENT 127 : 3619.
- 22 Munn, K (2000) GENETICS 156 : 245.
- 23 Myster, DL (2000) DEVELOPMENT 127 : 3249.
- 24 Huynh, JR (2000) DEVELOPMENT 127 : 2785.
- 25 Nasiadka, A (2000) DEVELOPMENT 127 : 2965.
- 26 Nilson, LA (1999) CUR. TOP.IN DEVEL. BIOL. 44 : 203.
- 27 Pazman, C (2000) DEVELOPMENT 127 : 1715.
- 28 Knaut, H (2000) JOURNAL OF CELL BIOLOGY 149 : 875.
- 29 Toyooka, Y (2000) MECHANISMS OF DEVELOPMENT 93 : 139.

- 30 Gissendanner, CR (2000) DEVELOPMENTAL BIOLOGY 221 : 259.
31 Linder, P (2000) YEAST 16 : 507.
32 Tanaka, SS (2000) GENES & DEVELOPMENT 14 : 841.
33 Cazorla, P (2000) JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 74 : 1829.

ZÁVORSZKY, P; JENNY, A, ST JOHNSTON, D, ERDÉLYI, M, EPHRUSSI, A

Structural role of *osk* mRNA during oogenesis, Közlés alatt. (2001).

Idézet összesen: 139

Független idézet: 132

Impakt faktor összesen: 41,85

Rövidítések jegyzéke:

Rövidítés	Név/Megnevezés	Magyarázat
A primer	Alsó primer	PCR-ben az alsó szál írását kezdő primer
BRE	Bruno response element	Cisz-ható Brunót kötő RNS szakasz.
<i>CyO</i>	Curly of Oyster	2. kromoszómás inverziós balanszerkromoszóma
<i>Df^{p^{XT103}}</i>	<i>oskar</i> deléción	<i>oskar</i> gént eltávolító deléción
DIG	digoxigenin	
<i>e</i>	<i>ebony</i>	fekete testszín
EGF	Epidermal Groth Factor	Fehérje motívum
F primer	Felső primer	PCR-ben a felső szál írását kezdő primer
<i>fs</i>	<i>female sterile</i>	recesszív nősténysterilitást jelölő előtag
M1	1-es transzlációs iniciációs hely.	Az OSK hosszú izoformáját íródik át.
M2	2-es transzlációs iniciációs hely.	Az OSK rövid izoformáját íródik át.
mRNS	messenger (hírvivő) ribonukleinsav	
Northern blot		RNS szint kimutatására alkalmas eljárást
NTR	Nem Transzlálódó Régió.	az RNS nem transzlálódó szakasza
OSK	OSKAR	Oskar fehérje
<i>osk</i>	<i>oskar</i>	Az <i>oskar</i> gént, vagy allélt jelent.
<i>osk¹⁸⁷</i>	<i>oskar</i> RNS hipomorf mutáns	új <i>oskar</i> mutáns mely egy <i>IF</i> elemet tartalmaz

<i>osk</i> ³⁴⁶	<i>oskar</i> fs mutáns	<i>oskar</i> RNS delokalizálódik, stop mutáció a harmadik exon elején,
<i>osk</i> ⁵⁴	<i>oskar</i> fs mutáns	<i>oskar</i> fehérje null mutáns <i>oskar</i> RNS delokalizálódik, stop mutáció az első exon végén,
<i>osk</i> ⁸⁴	<i>oskar</i> fs mutáns	<i>oskar</i> fehérje null mutáns <i>oskar</i> RNS delokalizálódik, stop mutáció az második exon közepén, <i>oskar</i> fehérje null mutáns
<i>osk</i> ^{A87}	<i>oskar</i> RNS null mutáns	új <i>oskar</i> mutáns mely egy <i>ZAM</i> retrótranszpozont tartalmaz az első exonban
PCR	Polimerase chain reaction	Polimeráz láncreakció technika
RNP	ribonukleoprotein	RNS-t és fehérjét tartalmazó komplex.
RT PCR	Reverz transzkripció PCR	Első lépcső: reverz transzkripcióval RNS-ről cDNS-t írnak át. Második lépcső: a cDNS-t PCR-ben használják.
<i>Sb</i>	<i>Stubble</i>	rövid szőrök a testen
<i>Ser</i>	<i>Serrate</i>	bevágót szárnyvég
<i>SM6b</i>	Second Multiple 6	2. kromoszómás inverziós balanszerkromoszóma
<i>TM3</i>	Third multiple 3	3. kromoszómás inverziós balanszerkromoszóma
UAS	Upstream Activator Sequence	Élesztőben Gal4 fehérjét kötő cisz aktiváló DNS szakasz.
VT	Vad típus	A vad <i>Ore-R</i> törzset jelenti
<i>w</i>	<i>white</i> = <i>fehér</i>	recesszív szemszín marker

Irodalmi hivatkozások listája:

Berleth,T., Burri,M., Thoma,G., Bopp,D., Richstein,S., Frigerio,G., Noll,M., and Nusslein-Volhard,C. (1988). The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 7, 1749-1756.

Boswell,R.E. and Mahowald,A.P. (1985). tudor, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 43, 97-104.

Boswell,R.E., Prout,M.E., and Steichen,J.C. (1991). Mutations in a newly identified *Drosophila melanogaster* gene, mago nashi, disrupt germ cell formation and result in the formation of mirror-image symmetrical double abdomen embryos [published erratum appears in *Development* 1991 Dec;113(4):preceding Table of Contents]. *Development* 113, 373-384.

Brand,A.H. and Perrimon,N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Chang,J.S., Tan,L., and Schedl,P. (1999). The *Drosophila* CPEB homolog, orb, is required for oskar protein expression in oocytes. *Dev. Biol.* 215, 91-106.

de Cuevas,M. and Spradling,A.C. (1998). Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development* 125, 2781-2789.

Ephrussi,A., Dickinson,L.K., and Lehmann,R. (1991). Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66, 37-50.

Ephrussi,A. and Lehmann,R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar [see comments]. *Nature* 358, 387-392.

Erdélyi,M., Michon,A.M., Guichet,A., Glotzer,J.B., and Ephrussi,A. (1995). Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization [see comments]. *Nature* 377, 524-527.

Fischer,J.A., Giniger,E., Maniatis,T., and Ptashne,M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* 332, 853-856.

Frohnhofer,H.G., Lehmann,R., and Nusslein-Volhard,C. (1986). Manipulating the anteroposterior pattern of the *Drosophila* embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 97 Suppl, 169-179.

Gavis,E.R., Curtis,D., and Lehmann,R. (1996). Identification of cis-acting sequences that control nanos RNA localization. *Dev. Biol.* 176, 36-50.

Gavis,E.R. and Lehmann,R. (1992). Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell* 71, 301-313.

Ghiglione,C., Carraway,K.L., III, Amundadottir,L.T., Boswell,R.E., Perrimon,N., and Duffy,J.B. (1999). The transmembrane molecule kerkon 1 acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis. *Cell* 96, 847-856.

Godt,D. and Tepass,U. (1998). *Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin- based adhesion [see comments]. *Nature* 395, 387-391.

Gonzalez-Reyes,A., Elliott,H., and St Johnston,D. (1995). Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* 375, 654-658.

Gonzalez-Reyes,A. and St Johnston,D. (1994). Role of oocyte position in establishment of anterior-posterior polarity in *Drosophila*. *Science* 266, 639-642.

Gonzalez-Reyes,A. and St Johnston,D. (1998). The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development* 125, 3635-3644.

Goode,S. and Perrimon,N. (1997). Inhibition of patterned cell shape change and cell invasion by Discs large during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 11, 2532-2544.

Guichet,A., Copeland,J.W., Erdélyi,M., Hlousek,D., Závorszky,P., Ho,J., Brown,S., Percival-Smith,A., Krause,H.M., and Ephrussi,A. (1997). The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature* 385, 548-552.

Gunkel,N., Yano,T., Markussen,F.H., Olsen,L.C., and Ephrussi,A. (1998). Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev.* 12, 1652-1664.

Iida,T. and Kobayashi,S. (1998). Essential role of mitochondrially encoded large rRNA for germ-line formation in *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11274-11278.

Illmensee,K. and Mahowald,A.P. (1974). Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 71, 1016-1020.

- Kashikawa,M., Amikura,R., Nakamura,A., and Kobayashi,S. (1999). Mitochondrial small ribosomal RNA is present on polar granules in early cleavage embryos of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Growth Differ.* **41**, 495-502.
- Kim-Ha,J., Kerr,K., and Macdonald,P.M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* **81**, 403-412.
- Kim-Ha,J., Smith,J.L., and Macdonald,P.M. (1991). oskar mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* **66**, 23-35.
- Kim-Ha,J., Webster,P.J., Smith,J.L., and Macdonald,P.M. (1993). Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of oskar mRNA. *Development* **119**, 169-178.
- King,R.C. (1970). *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*. Academic Press, N.Y.), pp. 1-227.
- Kislauskis,E.H., Li,Z., Singer,R.H., and Taneja,K.L. (1993). Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta- cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments [published erratum appears in *J Cell Biol* 1993 Dec;123(6 Pt 2):following 1907]. *J. Cell Biol.* **123**, 165-172.
- Lasko,P.F. and Ashburner,M. (1990). Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev.* **4**, 905-921.
- Leblanc,P., Dastugue,B., and Vaury,C. (1999). The integration machinery of ZAM, a retroelement from *Drosophila melanogaster*, acts as a sequence-specific endonuclease. *J. Virol.* **73**, 7061-7064.
- Lee,J.K., Brandin,E., Branton,D., and Goldstein,L.S. (1997). alpha-Spectrin is required for ovarian follicle monolayer integrity in *Drosophila melanogaster*. *Development* **124**, 353-362.
- Lehmann,R. and Nusslein-Volhard,C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell* **47**, 141-152.
- Lehmann,R. and Nusslein-Volhard,C. (1991). The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development* **112**, 679-691.
- Lehner,C.F. and O'Farrell,P.H. (1990). The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell* **61**, 535-547.

Lie,Y.S. and Macdonald,P.M. (1999). Apontic binds the translational repressor Bruno and is implicated in regulation of oskar mRNA translation. *Development* 126, 1129-1138.

Lin,H., Yue,L., and Spradling,A.C. (1994). The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* 120, 947-956.

Macdonald,P.M. (1990). bicoid mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development* 110, 161-171.

Macdonald,P.M. (1992). The *Drosophila* pumilio gene: an unusually long transcription unit and an unusual protein. *Development* 114, 221-232.

Macdonald,P.M., Luk,S.K., and Kilpatrick,M. (1991). Protein encoded by the exuperantia gene is concentrated at sites of bicoid mRNA accumulation in *Drosophila* nurse cells but not in oocytes or embryos [published erratum appears in *Genes Dev* 1992 Apr;6(4):690]. *Genes Dev.* 5, 2455-2466.

Macdonald,P.M. and Struhl,G. (1988). cis-acting sequences responsible for anterior localization of bicoid mRNA in *Drosophila* embryos. *Nature* 336, 595-598.

Mahowald,A.P. (1971). Polar granules of drosophila. IV. Cytochemical studies showing loss of RNA from polar granules during early stages of embryogenesis. *J. Exp. Zool.* 176, 345-352.

Mahowald,A.P. (1992). Germ plasm revisited and illuminated. *Science* 255, 1216-1217.

Mahowald,A.P. and Kambyseilis,M.P. (1980). Oogenesis. In *Genetics and biology of Drosophila*, M.Ashburner and T.R.F.Wright, eds. Academic Press, London), pp. 141-224.

Manseau,L.J. and Schupbach,T. (1989). cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 3, 1437-1452.

Markussen,F.H., Michon,A.M., Breitwieser,W., and Ephrussi,A. (1995). Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development* 121, 3723-3732.

McGrail,M. and Hays,T.S. (1997). The microtubule motor cytoplasmic dynein is required for spindle orientation during germline cell divisions and oocyte differentiation in *Drosophila*. *Development* 124, 2409-2419.

Micklem,D.R., Adams,J., Grunert,S., and St Johnston,D. (2000). Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J.* **19**, 1366-1377.

Miller,A. (1950). The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*. In *Biology of Drosophila*, M.Demerec, ed. John Wiley and Sons, N.Y.), pp. 420-534.

Monshausen,M., Putz,U., Rehbein,M., Schweizer,M., DesGroseillers,L., Kuhl,D., Richter,D., and Kindler,S. (2001). Two rat brain Staufen isoforms differentially bind RNA. *J. Neurochem.* **76**, 155-165.

Nakamura,A., Amikura,R., Mukai,M., Kobayashi,S., and Lasko,P.F. (1996). Requirement for a noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science* **274**, 2075-2079.

Neuman-Silberberg,F.S. and Schupbach,T. (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* **75**, 165-174.

Peri,F., Bokel,C., and Roth,S. (1999). Local *Gurken* signaling and dynamic MAPK activation during *Drosophila* oogenesis. *Mech. Dev.* **81**, 75-88.

Rastinejad,F. and Blau,H.M. (1993). Genetic complementation reveals a novel regulatory role for 3' untranslated regions in growth and differentiation. *Cell* **72**, 903-917.

Rastinejad,F., Conboy,M.J., Rando,T.A., and Blau,H.M. (1993). Tumor suppression by RNA from the 3' untranslated region of alpha- tropomyosin. *Cell* **75**, 1107-1117.

Ray,R.P. and Schupbach,T. (1996). Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* **10**, 1711-1723.

Rongo,C., Gavis,E.R., and Lehmann,R. (1995). Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development* **121**, 2737-2746.

Roth,S., Neuman-Silberberg,F.S., Barcelo,G., and Schupbach,T. (1995). *cornichon* and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* **81**, 967-978.

Ruohola,H., Bremer,K.A., Baker,D., Swedlow,J.R., Jan,L.Y., and Jan,Y.N. (1991). Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* 66, 433-449.

Sapir,A., Schweitzer,R., and Shilo,B.Z. (1998). Sequential activation of the EGF receptor pathway during *Drosophila* oogenesis establishes the dorsoventral axis. *Development* 125, 191-200.

Spradling,A.C. (1997). In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.

St Johnston,D., Beuchle,D., and Nusslein-Volhard,C. (1991). *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51-63.

St Johnston,D. and Nusslein-Volhard,C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68, 201-219.

Tomancak,P., Guichet,A., Závorszky,P., and Ephrussi,A. (1998). Oocyte polarity depends on regulation of *gurken* by *Vasa*. *Development* 125, 1723-1732.

Tracey,W.D., Ning,X., Klingler,M., Kramer,S.G., and Gergen,J.P. (2000). Quantitative analysis of gene function in the *Drosophila* embryo. *Genetics* 154, 273-284.

Van Doren,M., Williamson,A.L., and Lehmann,R. (1998). Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr. Biol.* 8, 243-246.

van Eeden,F. and St Johnston,D. (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 396-404.

Wang,C. and Lehmann,R. (1991). *Nanos* is the localized posterior determinant in *Drosophila* [published erratum appears in *Cell* 1992 Mar 20;68(6):1177]. *Cell* 66, 637-647.

Warn,R.M., Gutzeit,H.O., Smith,L., and Warn,A. (1985). F-actin rings are associated with the ring canals of the *Drosophila* egg chamber. *Exp. Cell Res.* 157, 355-363.

Wasserman,J.D. and Freeman,M. (1998). An autoregulatory cascade of EGF receptor signaling patterns the *Drosophila* egg [see comments]. *Cell* 95, 355-364.

Whitfield,W.G., Gonzalez,C., Sanchez-Herrero,E., and Glover,D.M. (1989). Transcripts of one of two *Drosophila* cyclin genes become localized in pole cells during embryogenesis. *Nature* 338, 337-340.

Xu,T., Caron,L.A., Fehon,R.G., and Artavanis-Tsakonas,S. (1992). The involvement of the Notch locus in *Drosophila* oogenesis. *Development* *115*, 913-922.